

Detecció i Estudi del Gen KRAS

Efectes de la mutació del gen KRAS en el càncer colorectal

Treball de recerca de segon de Batxillerat



Institut Maria de Bell-Lloc

Bigues i Riells, 27 de gener de 2012

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair al meu tutor de treball de recerca per haver-me estat ajudant fins i tot quan encara no era el meu tutor i per orientar-me sempre de la millor manera.

Agrair especialment al Dr. Marià Monzó i Planella, Catedràtic del Departament d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, per haver-me acollit al seu laboratori. Ell i el seu equip m'han supervisat i guiat al llarg de tots aquests mesos en els quals he dut a terme la meva estada pràctica al seu grup: Grup de Recerca d'Oncologia i Embriologia Molecular de l'Hospital Clínic-Universitat de Barcelona. M'agradaria agrair especialment a la Rut Tejero Villalba, al Gerardo Ferrer Aguilar i a la Tània Sánchez Diaz per ajudar-me amb tots els dubtes que he tingut i amb el que no sabia fer durant l'estada a l'Hospital Clínic. Gràcies a ells he pogut realitzar el meu treball de recerca sobre un dels temes que més m'impacta, la malaltia del càncer.

El meu pare ha intentat transmetre'm la seva experiència en el treball científic, donant-me consells al llarg de tot el procés. També vull agrair la meva mare per donar-me suport i ajuda en els moments més difícils. Ella, que no és gens familiar en temes científics, ha fet la llegida final del treball i m'ha aconsellat canviar el redactat d'alguns paràgrafs perquè és poguessin entendre millor.

Finalment agraeixo a tota la meva família i amics per ajudar-me sempre a tirar endavant amb el meu treball i amb el meu futur.

ÍNDIX

1	Introducció	3
1.1	Justificació del treball	3
1.2	Problema a investigar i hipòtesi	4
2	Marc teòric	5
2.1	Gens i mutacions	5
2.2	Introducció al càncer	7
2.2.1	Què és ?	7
2.2.2	És una malaltia hereditària?	9
2.2.3	Factors de risc	9
2.2.4	Tractaments	13
2.3	Càncer colorectal	16
2.4	Gens implicat en el càncer	21
2.5	Protooncogèn KRAS	24
3	Comprovació experimental de la hipòtesi. Identificació de la mutació del protooncogèn KRAS en un teixit tumoral humà	28
3.1	Disseny experimental	28
3.2	Extracció d'ADN de teixit colorectal humà	29
3.3	PCR d'amplificació	34
3.4	Visualització mitjançant electroforesis en gel d'agarosa	39
3.5	Purificació de ADN	42
3.6	PCR seqüenciació o terminació de la cadena	43
3.7	Seqüenciació del ADN	45
4	Resultats	46
4.1	Individu A	46
4.2	Individu B	49
4.3	Taula de resultats	51
5	Conclusió	52
6	Opinió personal	54
7	Glossari	55
8	Bibliografia	57
9	Annexos	60

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Justificació del treball

El càncer és la segona causa de mortalitat en els països desenvolupats, per darrere de les malalties cardiovasculars (Muñoz 1997). Actualment en aquests països, una de cada cinc persones mor a causa d'aquesta malaltia, incrementant la incidència any rere any. A més, encara que en els últims anys s'hagi avançat molt amb la recerca del càncer i amb la seva cura, en molts dels casos actualment els tractaments no són totalment eficaços. Per això amb aquest treball m'agradaria conscienciar de la importància d'aquesta malaltia a la nostra societat.

Aquestes són algunes de les raons que m'han portat a fer el treball de recerca relacionat amb el càncer. És una problemàtica social d'actualitat perquè sabem que ens pot afectar a tots nosaltres per igual. Del càncer en sentim molt a parlar, però quines són realment les causes del càncer? És una malaltia hereditària? Quins són els factors que fan augmentar la probabilitat que s'esdevingui la malaltia? Són moltes les preguntes que ens podem fer sobre aquesta malaltia i amb aquest treball n'he intentat resoldre algunes.

Durant els últims mesos he fet unes pràctiques de laboratori relacionades amb la malaltia i diagnosi mèdica del càncer. Les pràctiques han estat dirigides pel Dr. Marià Monzó Planella, Catedràtic i director del Grup de Recerca d'Oncologia i Embriologia Molecular del Departament d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona-Hospital Clínic. El laboratori de Biologia Molecular dirigit pel Dr. Monzó lidera diversos projectes relacionats amb la temàtica d'oncologia molecular i fan estudis clínics amb mostres de DNA i RNA de pacients oncològics (que pateixen de càncer) de l'Hospital Clínic.

El meu treball s'ha centrat en l'estudi del protooncogèn KRAS, que són les inicials en anglès de *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)*. Més endavant, a l'apartat 2.4, es definirà el terme *protooncogèn*. Aquest protooncogèn, al mutar, agreuja els casos de càncer colorectal i per tant, és molt important la detecció de la mutació. Concretament, vaig fer el treball de recerca en l'estudi dels efectes de les mutacions d'aquest gen i en la metodologia per identificar la mutació del KRAS.

1.2 Problema a investigar i hipòtesi

El problema que em vaig plantejar al meu treball va ser qüestionar-me si els teixits extrets d'un tumor de càncer colorectal d'un pacient malalt de càncer presentaven la mutació del gen KRAS. Com s'ha dit abans, la mutació d'aquest gen afavoreix la presència d'aquest tipus de tumor. A partir d'aquest problema vaig formular la següent hipòtesi: un teixit afectat de càncer colorectal podria presentar la mutació del gen KRAS, en canvi, si el teixit no pertany a un tumor de pacient afectat per càncer colorectal, no hi hauria d'haver la presència de cap mutació.

Per resoldre aquesta qüestió i per poder validar la meva hipòtesi, vaig fer l'esmentat treball de laboratori, en el qual es basa el meu treball de recerca. Abans de començar a explicar la pràctica he situat el meu treball en un marc teòric relacionat amb el tema per poder entendre millor l'estudi que he fet i situar-lo en el context de l'afectació de les malalties de càncer en la societat actual.

2. MARC TEÒRIC

2.1 Gens i mutacions

L'àcid desoxiribonucleic (ADN o *DNA*, en les seves sigles en anglès) és una biomolècula present a l'interior del nucli de totes les cèl·lules dels organismes vius. Aquesta molècula conté les instruccions genètiques utilitzades en el desenvolupament i el funcionament de tots els éssers vius coneguts, tant unicel·lulars com pluricel·lulars, així com en alguns virus. La funció principal de les molècules d'ADN és l'emmagatzematge d'informació genètica. Aquesta informació és la necessària per sintetitzar proteïnes i per tant, per a un funcionament correcte de les cèl·lules i les funcions que duen a terme en el cos.

L'ADN es troba en forma de doble hèlix formada per dues cadenes. La seva unitat estructural bàsica són els nucleòtids, formats per una pentosa (glúcid de 5 carbonis), un grup fosfat i una base nitrogenada (Figura 1).

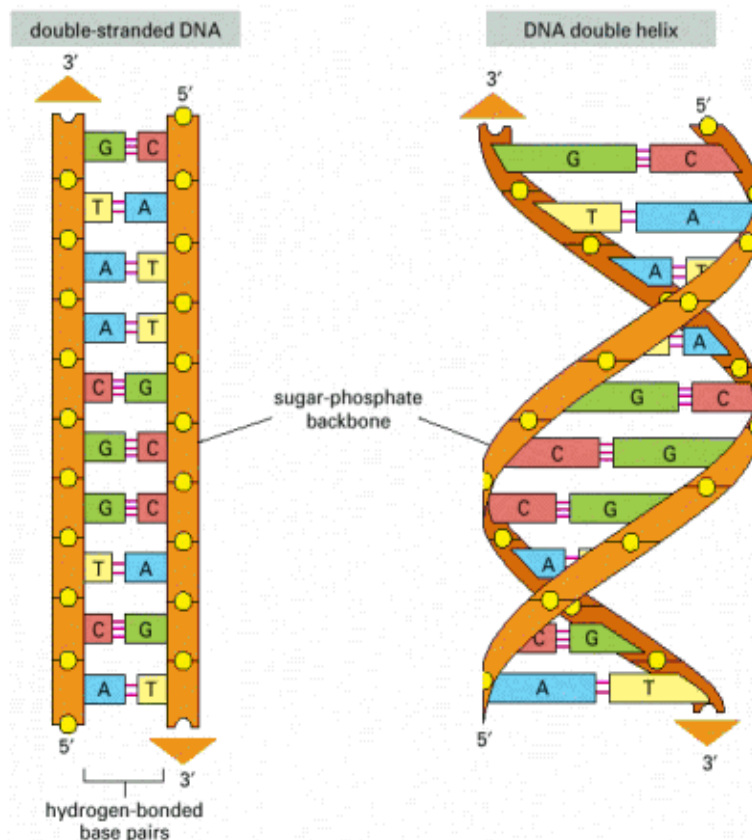


Figura 1. Cadena d'ADN amb els seus corresponents nucleòtids. T: Timina; G: Guanina; A: Adenina; C: Citosina. **Font:** Gràfic extret de Google imatges:

<http://www.monografias.com/trabajos58/identificacion-criminales-adn/identificacion-criminales-adn4.shtml>.

Les bases nitrogenades (dNTPs, en anglès *Hydrogen-bonded base pairs*) de l'ADN que formen part dels nucleòtids poden ser l'adenina (A), la timina (T), la guanina (G) o la citosina (C). Aquestes bases nitrogenades són les que donen caràcter bàsic a l'ADN, a més de ser les responsables de la seva especificitat, és a dir, del caràcter únic i diferent de cada molècula d'ADN. Cal tenir present, però, que totes les molècules d'ADN de totes i cadascuna de les cèl·lules d'un mateix individu són iguals.

Les cadenes de l'ADN estan unides entre si mitjançant ponts d'hidrogen entre les bases complementàries. És a dir, l' Adenina s'ajunta amb la Timina i la Guanina amb la Citosina i així al llarg de tot l'ADN. Per conèixer la informació genètica i les característiques de qualsevol ésser viu s'han d'identificar les seves bases nitrogenades i el seu ordre, això s'anomena la seqüenciació de l'ADN.

Un gen és una seqüència lineal de nucleòtids (és a dir, un tros d'ADN) i és essencial per a una funció específica, ja sigui en el desenvolupament de l'ésser o en el manteniment d'una funció fisiològica i estructural normal de l'organisme.

Quan la informació genètica d'un gen (és a dir, la seqüència normal de nucleòtids) canvia per diverses causes, que a continuació detallarem, es diu que hi ha hagut una mutació genètica. Aquesta mutació pot ser deguda a la falta d'un nucleòtid, que hi hagi més nucleòtids del compte o que se n'hagin substituït uns per uns altres.

Les causes principals d'una mutació genètica són fonamentalment dues:

- Per errors en el mecanisme de replicació de l'ADN o durant la mitosi¹ o meiosi².
- Per l'acció sobre l'ADN per part d'agents mutàgens externs, com per exemple, les radiacions UV o ionitzants, agents químics, entre d'altres.

Els efectes de les mutacions són molt variats, des d'insignificants fins a letals, depenent si afecten la funcionalitat d'una proteïna bàsica per l'organisme que a llarg termini podria provocar l'aparició d'una malaltia.

El fet que les mutacions puguin afectar una proteïna és perquè aquestes es formen a partir de la informació de l'ADN. L'ADN es transcriu³ a ARN⁴ per poder sortir del nucli cel·lular i poder dur a terme la síntesi de proteïnes a través dels ribosomes⁵ (Figura 2).

Les proteïnes són cadenes d'aminoàcids i aquestes són formades a través de la traducció⁶ en què cada 3 nucleòtids (codó) donen lloc a un aminoàcid. Per exemple CAA donarà lloc a l'aminoàcid Glutamina. Així doncs, podem veure la relació directa entre ADN i proteïnes. Un fragment d'ADN donarà informació per crear una proteïna en concret.

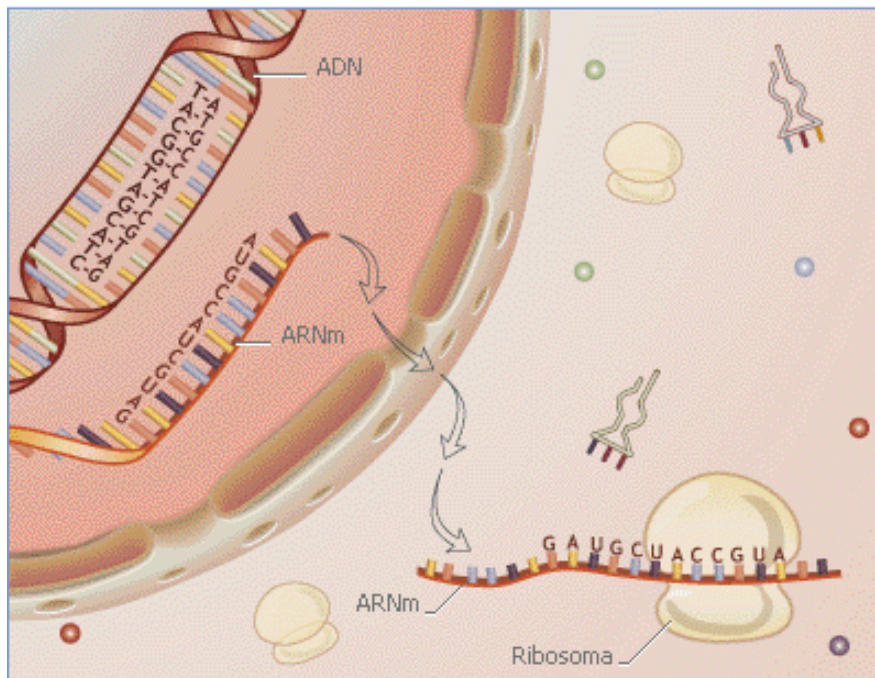


Figura 2. Procés de síntesi de les proteïnes. **Font:** imatge extreta de Google imatges.

La relació entre cada 3 nucleòtids i l'aminoàcid per al qual dona informació, és igual per a tots els éssers vius, és a dir, és universal i està descrit en el codi genètic (**Veure Annex 1**).

2.2 Introducció al càncer

2.2.1 Què és?

El càncer és un conjunt de malalties caracteritzades pel creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules d'un organisme que acaben envaint i danyant teixits i òrgans, provocant en alguns dels casos la mort d'aquest organisme (Figura 3).

El creixement exponencial i descontrolat de cèl·lules és degut a una mutació inicial a una sola cèl·lula, provocada majoritàriament per agents externs, que finalment acaba creant

tumors. Els tumors són l'augment de volum que pateixen els teixits malalts. Així doncs, es pot afirmar que els tumors són monoclonals (deriven d'una sola cèl·lula) ja que totes les cèl·lules d'un tumor presenten les mateixes característiques genètiques. Tot i així, les cèl·lules d'un tumor no són totes idèntiques, sinó que la formació del tumor implica l'acumulació successiva d'alteracions en els gens.

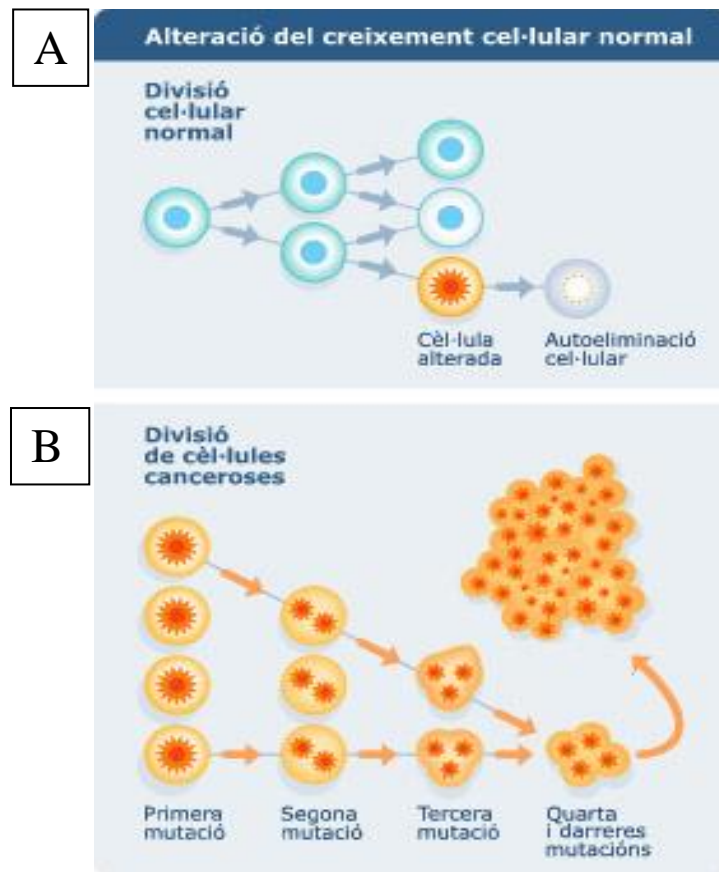


Figura 3. Comparació entre una divisió normal de les cèl·lules (A) i una divisió amb cèl·lules canceroses on es pot veure el creixement exponencial d'aquestes cèl·lules malaltes (B). **Font:** www.gencat.cat.

Existeixen dos tipus de tumors, els que anomenem tumors benignes i els tumors malignes. Si només té lloc un augment del creixement d'un grup de cèl·lules en el lloc on normalment estaven, és un tumor benigne i es cura mitjançant l'extirpació del tumor. Quan les cèl·lules d'un tumor són capaces d'envair els teixits circumdants a través del flux sanguini, es parla d'un tumor maligne, i és quan clínicament es parla de càncer o tumor cancerigen.

Aquesta capacitat invasiva que permet escapar les cèl·lules del seu lloc natural en l'organisme i colonitzar i proliferar en altres teixits o òrgans s'anomena el procés de metàstasi.

Les metàstasis són les responsables de la disminució de l'eficàcia dels tractaments i per tant, una de les causes de mort per càncer més important. Així doncs, els tractaments seran més eficaços si el càncer encara no ha entrat a una fase de metàstasi avançada.

2.2.2 És una malaltia hereditària?

El càncer és una malaltia genètica, però generalment no hereditària. Comença amb la mutació del material genètic d'una cèl·lula qualsevol, però només serà hereditari si afecta els gàmetes (espermatozoides i òvuls). Quan els gàmetes presenten el material genètic mutat, el material genètic de la descendència procedirà d'aquestes cèl·lules afectades i per tant, el nou individu té més probabilitats d'acabar sent afectat per una malaltia de càncer. Per tant, si la mutació afecta sols a les cèl·lules somàtiques (la resta de cèl·lules d'un organisme que no són gàmetes) del nostre cos no es parla de càncer hereditari ja que la informació d'aquestes cèl·lules no passa als nostres fills.

2.2.3 Factors de risc

Els factors de risc són aquells que fan augmentar la probabilitat que un individu presenti un càncer. El principal factor de risc és l'edat, però actualment se sap que molts càncers estan relacionats amb l'estil de vida que portem. Així doncs, per intentar prevenir el càncer hem d'intentar evitar aquests factors, tot i que evidentment el factor de l'edat sigui inevitable (**Veure Annex 2**).

- **Edat:** Aquest és el principal factor de risc per desenvolupar un càncer. L'edat provoca una major probabilitat d'acumular mutacions degut al gran número de divisions cel·lulars que ha fet un individu amb el pas del temps. A part també s'ha de considerar que els individus d'edat avançada han estat més temps exposats a agents cancerígens externs (Figura 4).

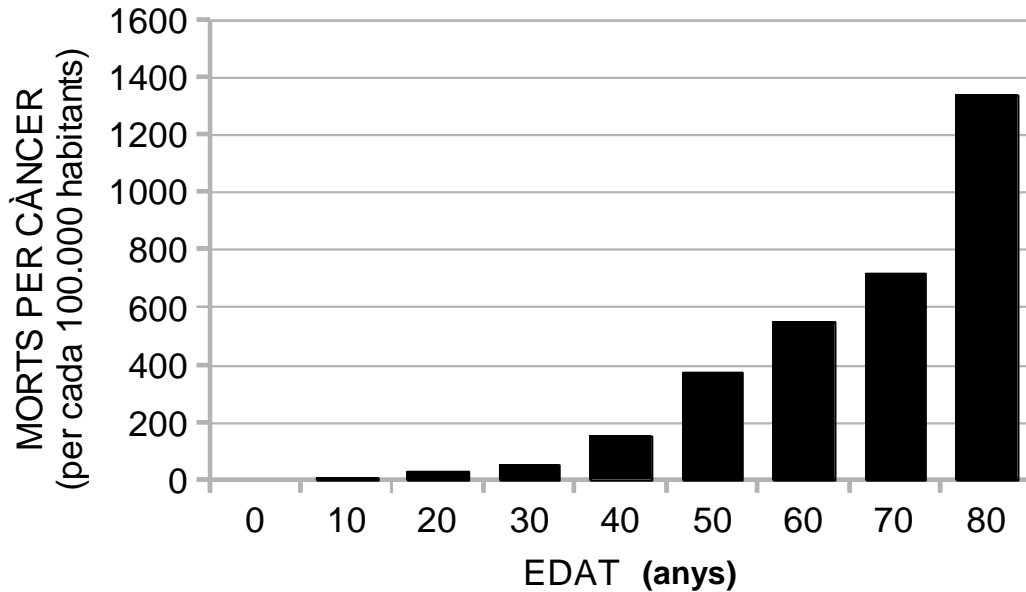


Figura 4. Mortalitat per càncer a Espanya durant l'any 1992 per grups d'edat (amb anys) on es veu clarament com augmenta la incidència a mesura que augmenta l'edat. **Font:** Modificat per l'autor del treball a partir de la informació publicada pel *Ministerio de Sanidad y Consumo* del Govern d'Espanya.

- **Tabac:** el 90% del casos de càncer de pulmó està lligat amb el fet de consumir tabac. Això s'explica per l'elevat nombre de substàncies tòxiques que contenen les cigarretes i que van a parar directament al pulmó. Els casos d'aquest càncer estan augmentant molt ràpidament des de principis del s.XX, sobretot en països desenvolupats (Muñoz, 1997). Tot i que fa unes dècades les dones no presentaven incidència d'aquest càncer, actualment degut al major consum de tabac per part de les dones, pràcticament s'ha igualat a la taxa d'afectació presentat pels homes.

El càncer de pulmó no és l'únic generat pel consum de tabac, sinó que també hi estan relacionats el càncer de laringe, de boca, de gola, d'esòfag, d'estómac, de pàncrees, de ronyó i de bufeta urinària.

La Taula 1 representa la relació que hi ha amb la ingestió d'alcohol i el consum de tabac en fumadors durant més de 20 anys i la probabilitat que aparegui un càncer de faringe. Podem observar que amb un número fix de cigarretes, com més begudes alcohòliques beguis, més probabilitat tens de desenvolupar un càncer de faringe.

Taula 1. Relació entre el consum de begudes alcohòliques i cigarretes amb la probabilitat de patir un càncer de faringe. **Font:** adaptada per l'autor del treball. Font original: de Blots i cols (1998), Cancer Res., 48:3282.

Núm. Cigarretes per dia	Número de begudes alcohòliques per setmana				
	0	De 1 a 4	De 5 a 14	De 15 a 29	Més de 30
1 - 19	1,7 %	1,5%	2,7%	5,4%	7,9%
20 - 39	1,9%	2,4%	4,4%	7,2%	23,8%
+40	7,9%	0,7%	4,4%	20,2%	37,7%

- **Dieta:** tot i que no existeixen aliments que evitin totalment o que curin el càncer, les persones amb una dieta pobre en fruites i vegetals i amb excés de greixos d'origen animal, tenen més risc de patir un càncer. També és important la conservació que han tingut aquests aliments, com per exemple si aquests aliments han estat exposats a certs plaguicides. També és important la forma amb què han aquests aliments han estat cuinats.
- **Exercici:** El fet de fer exercici regularment també pot fer reduir la probabilitat de contraure un càncer.
- **Alcohol:** el consum diari de begudes alcohòliques al llarg del temps de més de dues unitats al dia en els homes i més d'una en les dones, pot incrementar el risc de desenvolupar algun tipus de càncer, com ara el de boca, gola, laringe, esòfag, fetge i mama (Veure dades a la Taula 1 de la incidència de càncer entre la població que consumeix regularment alcohol i tabac).
- **Radiació UV (solar):** és el principal factor de risc dels càncers de pell ja que danya directament el DNA provocant mutacions. Aquestes radiacions també es poden produir amb els tractaments de bronzejat artificials amb rajos UVA. La Generalitat té programes perquè la gent actuï de forma correcta a l'estiu davant del sol (**Veure Annex 3**).
- **Virus i bacteris:** les infeccions víriques o bacterianes poden generar alguns tipus de càncer, com per exemple el de coll uterí. Una infecció crònica persistent del

Papil·lomavirus humà transmès per contacte sexual pot provocar càncer de coll uterí. També el virus de l'hepatitis B o C pot provocar càncer de fetge després que hagin passat anys de la infecció. Darrerament també s'ha detectat una incidència molt elevada del virus del VIH (*virus de la immunodeficiència humana*) que augmenta el risc de desenvolupar una leucèmia.

- **Hormones:** durant el procés de la menopausa és possible que estigui indicada la utilització de la teràpia hormonal per millorar alguns símptomes. Aquestes hormones poden augmentar el risc de desenvolupar càncer de mama, problemes cardíacs o fins i tot, embòlies. També són perillosos els anticonceptius perquè són tractaments hormonals que alteren la funció normal del cos.
- **Productes químics o altres substàncies:** Les persones que treballen en llocs on estan exposades a certes substàncies i no prenen les mesures de seguretat adequades, tenen més risc de desenvolupar càncer ja que moltes d'aquestes substàncies poden ser mutàgenes.

Taula 2. Tipus de càncer provocats per substàncies tòxiques. **Font:** Modificat de Dr. Josep Vaqué/ Hospital Universitari Vall d'Hebron. Facultat de Medicina, UAB.

Exposició a:	Òrgans afectats i que poden desenvolupar tumors:
Arsènic	Pell, pulmó
Amiant	Pulmó
Benzé	Medul·la òssia
Benzidina	Bufeta urinària
Crom	Pulmó
Quitrà	Pell
Olis minerals	Pell
Naftilamina	Bufeta urinària
Niquel	Fosses nasals, pulmó
Sutge	Pell, pulmó
Clorur de vinil	Fetge

2.2.4 Tractaments

Abans de parlar de tractaments, és molt important parlar sobre la detecció precoç, ja que és crucial detectar el càncer abans que entri en fase de metàstasi. Un cop s'ha produït metàstasi, els tractaments són molt més complexos i no sempre resulten eficaços.

Aquests mètodes de detecció precoç depenen de cada tipus de càncer. En el següent apartat parlaré específicament d'aquests mètodes aplicats al càncer colorectal, ja que el meu treball es centra en les mutacions que causen aquest tipus de càncer.

El cos humà pot presentar alguns indicis molt importants que poden ser motiu per sotmetre's a una revisió mèdica ràpidament. Per exemple, el canvi d'hàbits intestinals o urinaris, la pèrdua de sang, la presència de llagues que no cicatritzen, un canvi obvi en una berruga o en una piga, ronquera o tos inhabitual. Sobretot la simptomatologia més important és la presència de *bonys* en qualsevol part del cos. Aquesta presència de *bonys* és, per exemple, molt important en la detecció del càncer de mama. És un càncer amb molta incidència sobre les dones i és important que a partir d'una certa edat es palpin els pits per identificar la presència d'irregularitats i sobretot és molt important fer-se mamografies anualment.

Una de les dificultats dels tractaments existents avui en dia, és la necessitat d'eliminar absolutament totes les cèl·lules canceroses. Només que sobrevisqui una única cèl·lula cancerosa després de l'extirpació del tumor per tractament quirúrgic o per tractament radiològic o químic, aquesta cèl·lula cancerosa pot tornar a generar un tumor degut a la seva gran capacitat de proliferació. El segon problema d'aquests tractaments del càncer és la falta d'especificat degut a què és molt difícil diferenciar una cèl·lula cancerosa d'una cèl·lula normal. Tot i així, els tractaments han millorat notablement en els últims anys i això ho demostren les gràfiques de mortalitat per càncer a Catalunya, Espanya i a la resta d'Europa (Figura 5).

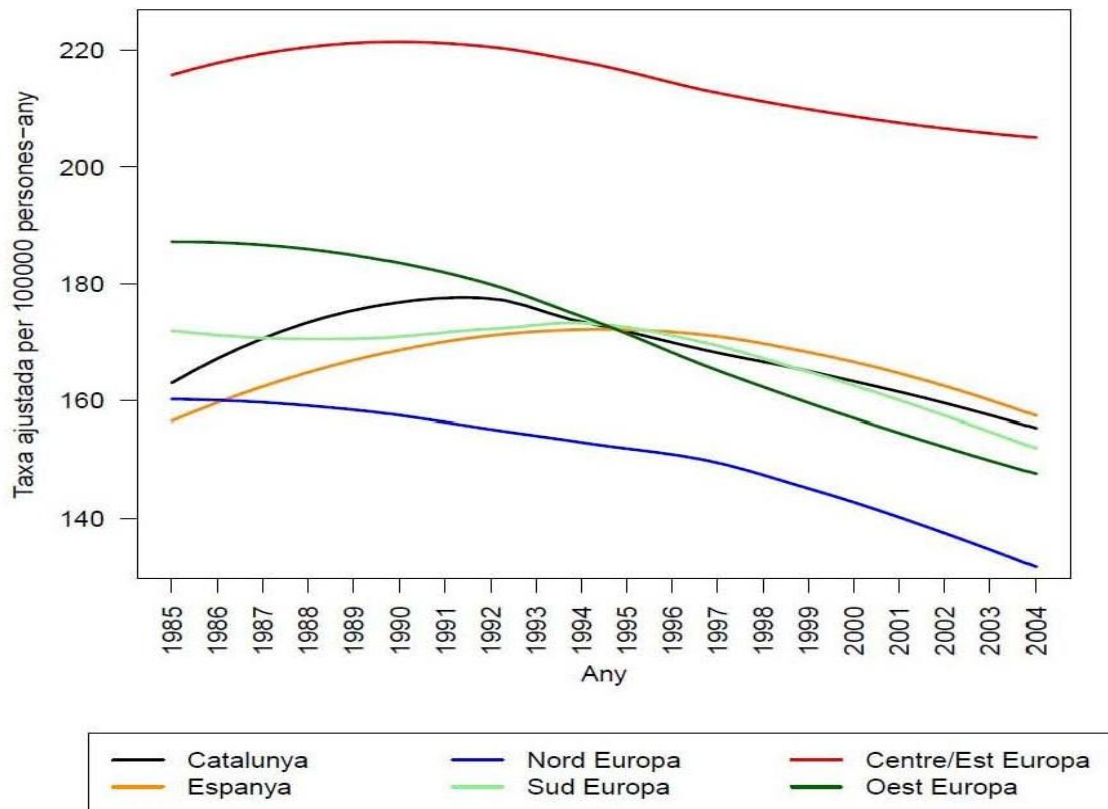


Figura 5. Tendència de les taxes ajustades a la mortalitat per càncer a Catalunya, Espanya i a la resta d'Europa. Període 1985-2004. **Font:** Extreta de la Generalitat de Catalunya; Font original: Cancer incidence in five continents. Volumes VI-IX.

Hi ha diferents tipus de tractaments, però per saber quin fer servir en cada cas i cada quan aplicar-ho, depèn de diversos factors, com ara el tipus i la localització del tumor, l'extensió de la malaltia en el moment del diagnòstic o, entre altres, les característiques individuals de la persona en relació amb la salut. Així doncs, l'elecció del tractament requereix una valoració individual de cada cas.

Els principals tractaments contra el càncer són la cirurgia, la radioteràpia i la quimioteràpia. Però hi ha altres menys corrents com l'hormonoteràpia. Aquest és un tractament que actua sobre algunes hormones concretes del cos. S'ha descobert que alguns tumors necessiten aquestes hormones per créixer, com ara alguns tipus de càncer de mama i de pròstata. També hi ha tractaments amb teràpies biològiques que actuen

ajudant el sistema immunològic (les defenses del cos) a lluitar contra el càncer. Aquestes teràpies només actuen contra les cèl·lules malignes i no sobre les sanes, per tant hi ha menys efectes secundaris i generalment són molt més ben tolerats pel cos humà.

Finalment, un darrer tractament el trobem en els trasplantaments d'òrgans i teixits, com el de la medul·la òssia a partir de cèl·lules mare.

A continuació explicaré en què consisteixen els tres tractaments principals en les malalties de càncer:

Cirurgia

Sovint és la primera opció perquè es pot aplicar tant en alguns processos diagnòstics com en el tractament. Però la cirurgia moltes vegades no és eficaç per curar totalment el càncer ja que a part de la raó esmentada anteriorment que sempre pot quedar alguna cèl·lula cancerígena, pot haver-hi l'existència d'una micrometàstasi, és a dir, encara que de forma inapreciable, les cèl·lules cancerígenes ja poden haver iniciat el procés de metàstasi per diferents teixits del cos. Per aquest motiu, cal tornar a emfatitzar en la importància de la detecció precoç.

Així doncs, l'extirpació del tumor pot ser útil per identificar el tipus de càncer, i entre d'altres, per veure si les cèl·lules cancerígenes ja s'han dispersat pel cos. A més, encara que no es pugui extirpar del tot el tumor, l'extirpació per cirurgia pot reduir la mida del tumor i així facilitar l'eficàcia d'altres mètodes i tractaments. Això també pot ser útil per millorar alguns símptomes.

Radioteràpia

La radioteràpia intenta impedir la proliferació de les cèl·lules tumorals a través de la radiació amb raigs X i gamma. Amb aquest tractament també es pot arribar a produir una mort cel·lular degut al fet que els raigs X poden danyar directament el DNA. La radioteràpia s'utilitza per tractar alguns tipus de càncer, però no és possible aplicar-la a tots els càncers i sols es pot utilitzar quan el tumor es troba en llocs molt focalitzats. La radioteràpia també pot afectar els teixits sans propers, així doncs pot causar efectes secundaris com fatiga, pèrdua de pèl i irritació a la zona irradiada.

Quimioteràpia

La quimioteràpia és l'actuació d'agents químics citotòxics⁷ sobre les cèl·lules que es divideixen ràpidament, tant en les canceroses com en les sanes. Per això hi ha la possibilitat que apareguin efectes secundaris, que poden ser de tipus i d'intensitats diferents, segons el medicament utilitzat, la dosi i la durada. Els efectes secundaris segons el tipus de cèl·lules que ataca la quimioteràpia són els següents:

- Si afecten les cèl·lules de la sang pot augmentar el risc d'infeccions, o de tenir més facilitat d'hematomes o de sagnar, i de sentir-se més feble i cansat que habitualment.
- Si afecta les cèl·lules de les arrels del cabell es pot produir pèrdua del cabell, o canvi de color i de la seva consistència.
- Si afecte les cèl·lules del tracte digestiu (aquelles que es troben a la boca, a l'estómac i en altres parts de l'aparell digestiu) es podria produir pèrdua de l'apetit, nàusees, vòmits, diarrea, dificultat per empassar o fins i tot poden aparèixer algunes llagues a la boca i als llavis.

2.3 Càncer colorectal

El càncer colorectal és la malaltia en el qual se centra el meu Treball de Recerca i per aquest motiu he considerat oportú presentar un apartat introductori de la incidència d'aquest càncer a la nostra societat, de les causes que poden provocar la malaltia, dels tractaments i d'altres aspectes generals d'anatomia de l'aparell colorectal.

Incidència

El càncer colorectal (de budell gruixut) es considera actualment un problema greu de salut a Catalunya. És el segon càncer més freqüent en les dones i el tercer en els homes. Aproximadament, 13.000 homes i 14.000 dones conviuen amb un diagnòstic de càncer colorectal a Catalunya (Figura 6). A Catalunya aquest tipus de càncer té una supervivència, als 5 anys de detecció, del 50% dels afectats.

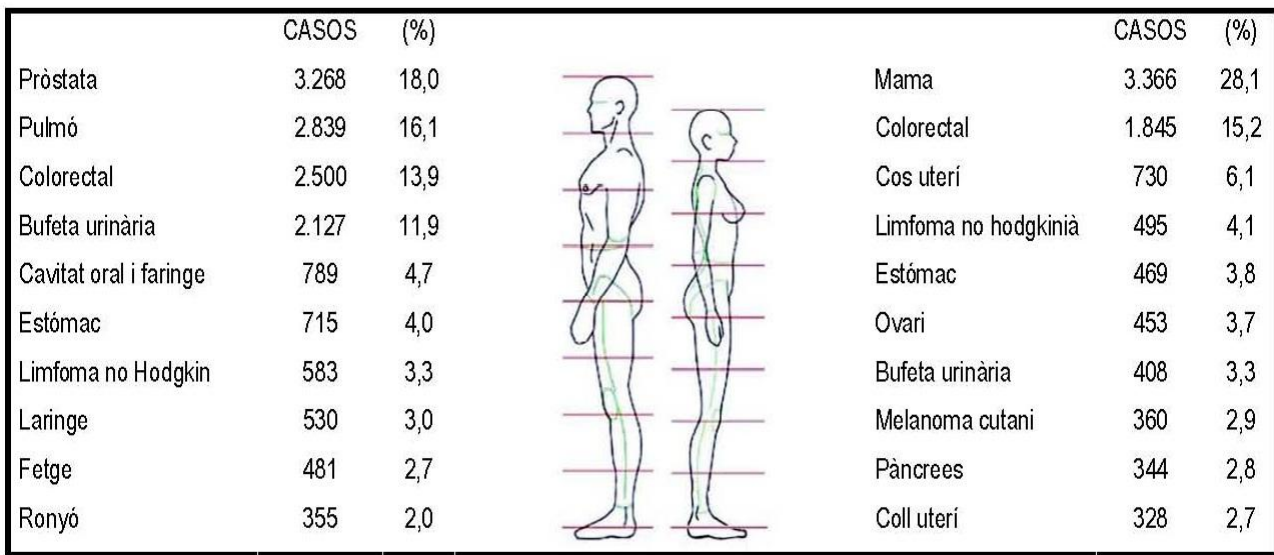


Figura 6. Casos nous de càncer anuals i freqüència relativa per als deu càncers més freqüents a Catalunya. Període 1998-2002, segons sexe. **Font:** [www.Gencat.cat/Estadístiques del càncer](http://www.Gencat.cat/Estadístiques%20del%20càncer).

En el context europeu, a Catalunya el càncer colorectal presenta una incidència elevada, sobretot en homes; aquest fet és una conseqüència de l'augment significatiu dels casos observat en els últims anys (Figura 7). En canvi, segons les estadístiques de la Generalitat de Catalunya, la mortalitat mostra una tendència estable o decreixent entre 1995 i 2004, en ambdós sexes (Figura 8).

Comparant les estadístiques d'incidència entre Europa i altres parts del món, trobem que segons una notícia recent publicada a la prestigiosa revista científica *Nature Medicine*, aquest 2011 s'han detectat 141.210 nous casos als Estats Units d'Amèrica (Maxwell, H. P. 2012). Aquests percentatges d'incidència de la malaltia als EUA són proporcionalment semblants a la incidència que trobem a Catalunya i als de la resta d'Europa. No es tenen dades fiables de la incidència d'aquest càncer a altres continents industrialment menys desenvolupats, com per exemple Àsia i Àfrica.

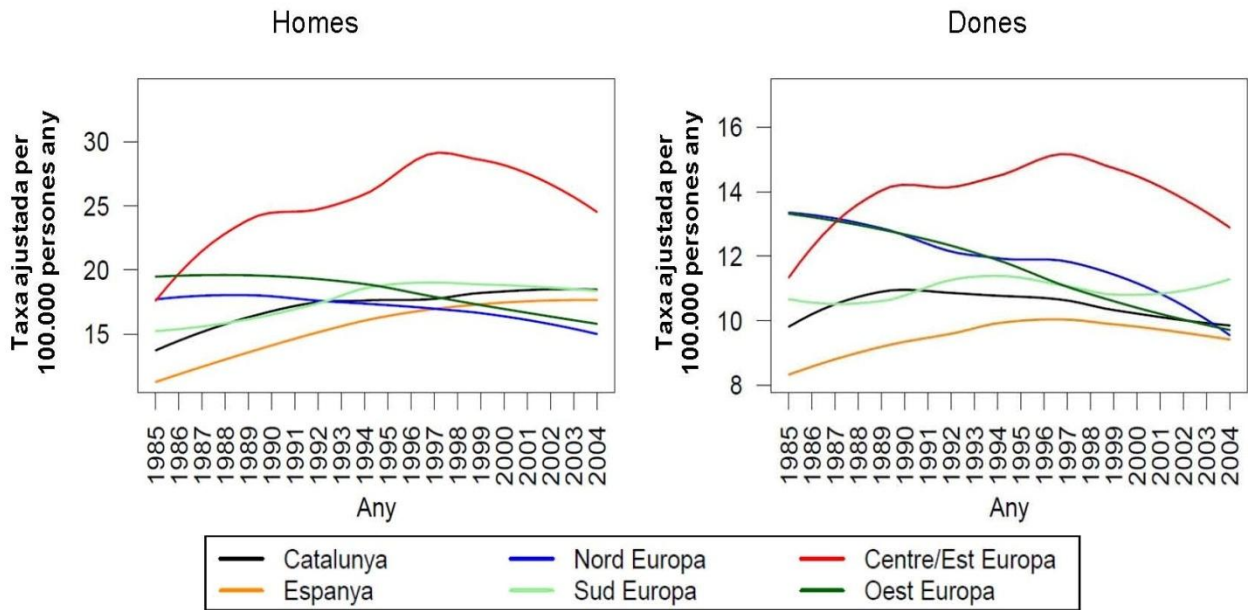


Figura 7. Evolució de la tendència temporal de la incidència per càncer colorectal a Catalunya, Espanya i a la resta d'Europa. Període 1985-2002. **Font:** Extreta de la Generalitat de Catalunya; **Font:** *Cancer incidence in five continents*, Volums VI-IX.

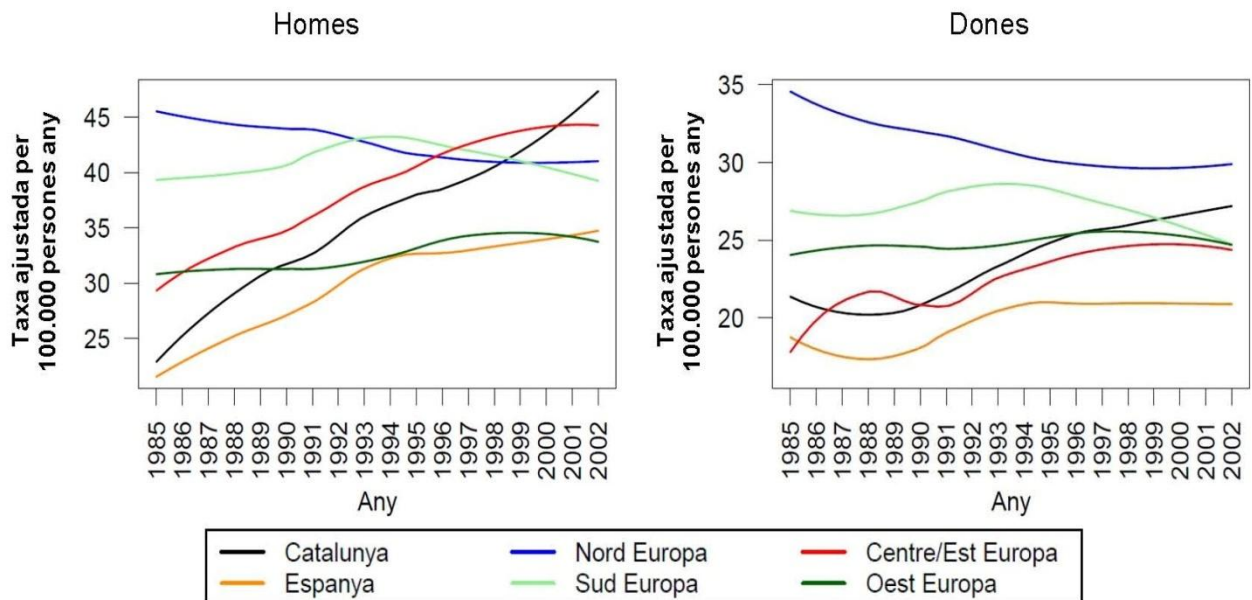


Figura 8. Evolució de la tendència temporal de la mortalitat per càncer colorectal a Catalunya, Espanya i a la resta d'Europa. Període 1985-2004. **Font:** Extreta de la Generalitat de Catalunya; **Font:** *Cancer incidence in five continents*, Volums VI-IX.

Anatomia i aspectes generals

El còlon i el recte formen part d'un òrgan tubular conegut com a budell gruixut que forma part de l'aparell digestiu (Figura 9). Els últims 15cm del budell gruixut corresponen al recte.

Un pòlip colorectal (tumor) és un creixement anormal a la superfície interna (o mucosa) del còlon o del recte.

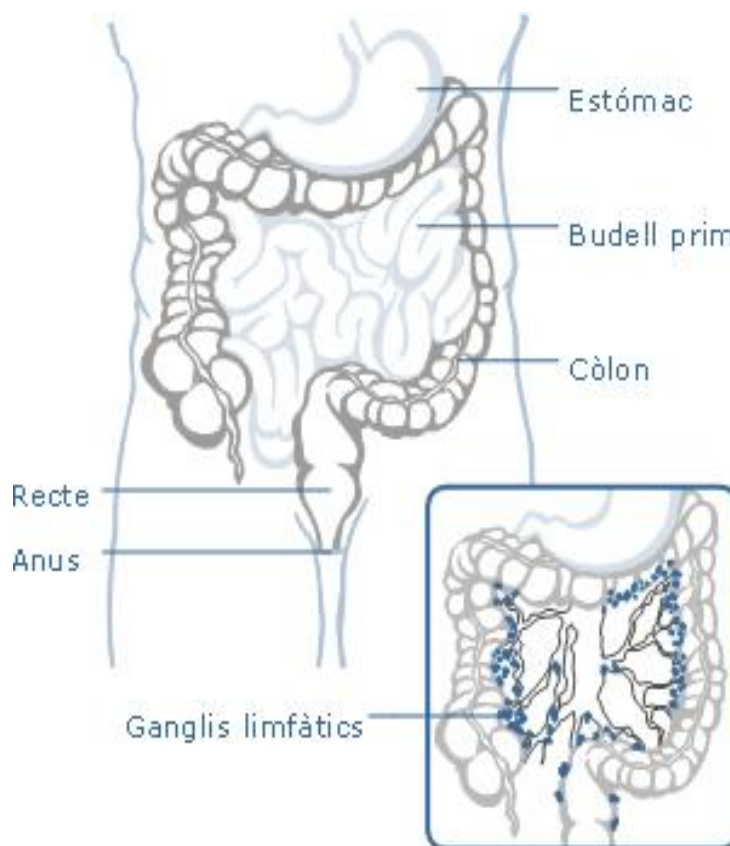


Figura 9. Representació d'una part de l'aparell digestiu on es troba el còlon i el recte. **Font:** [www.gencat.cat/Càncer colorrectal](http://www.gencat.cat/Càncer_colorrectal).

La presència de pòlips a la mucosa del budell és freqüent entre la població, i no sempre constitueixen un càncer. Però amb el temps, quan es troben més enllà de la mucosa on s'ha originat, es poden trobar cèl·lules malignes o bé metàstasis en altres òrgans i per tant, originar-se un càncer. Els pòlips es poden detectar i eliminar per evitar que es transformin en un càncer i per això és important la detecció precoç.

A la ciutat de Barcelona hi ha en marxa un programa de detecció precoç del càncer colorectal (**Veure Annex 4**) que s'adreça a homes i dones d'entre 50 i 69 anys. Consisteix en fer-se cada dos anys una prova senzilla per detectar si els excrements contenen petites quantitats de sang. La presència de sang és un dels senyals que indica que hi podria haver un càncer colorectal, degut al fet que els pòlips poden sagnar sense produir cap molèstia. Així doncs, aquest mètode de detecció precoç serveix per diagnosticar els casos el més aviat possible i d'aquesta manera sigui més fàcil tractar el tumor.

Factors de risc

Hi ha un seguit de factors de risc que augmenten les possibilitats de patir un càncer colorectal:

- Edat: Com en tot càncer és el principal factor de risc i la majoria dels casos solen donar-se en la franja de població per sobre dels 50 anys.
- Si ja has patit un càncer colorectal anteriorment o presentes pòlips colorectals tens més probabilitats de patir un altre cop aquest tipus de càncer.
- Colitis ulcerosa o malaltia de Crohn: És una malaltia inflamatòria intestinal. Les persones que han patit aquesta malaltia durant anys, tenen més risc de desenvolupar càncer colorectal.
- Antecedents familiars de càncer colorectal.
- Alimentació amb un elevat consum de carns vermelles, greixos d'origen animal i d'alcohol i un escàs consum de vegetals, fruita i fibra.
- L'excés de pes i la manca d'exercici físic també són factors de risc.

Síntomes

Els símptomes del càncer colorectal són diversos i poc específics, poden ser causats per altres problemes de salut. Aquests poden ser: canvi en els hàbits intestinals, sang a la femta, molèsties a l'abdomen, pèrdua de pes, anèmia (baix nivell de glòbuls vermells), entre d'altres.

Tractaments

Les opcions de tractament del càncer colorectal depenen de la localització del tumor en el còlon o en el recte, i del grau d'extensió, així com de la situació de salut específica de cada persona. El tractament contempla diverses teràpies (la cirurgia, la quimioteràpia, les teràpies biològiques o la radioteràpia, explicades anteriorment) que poden ser aplicades de forma individual o una combinació entre elles.

Actualment, s'estan fent molts assaigs clínics i investigacions sobre nous tractaments per aquesta malaltia o per prevenir-la. Una d'aquestes investigacions s'ha centrat en l'estudi de l'aspirina com a mètode per prevenir el càncer colorectal. Múltiples assaigs clínics han demostrat resultats positius, però encara està en vies d'investigació (Maxwell, 2012).

2.4 Gens implicats en el càncer

Com hem vist anteriorment, el càncer s'inicia a partir d'una cèl·lula que creix i es divideix contínuament sense control. Això comporta una proliferació excessiva de cèl·lules en un determinat teixit. Aquesta falta de control és el resultat de la mutació inicial en algun gen implicat en el cicle cel·lular. Com a resultat de la mutació iniciadora o de l'acumulació de diverses mutacions el teixit creix formant un tumor que pot provocar metàstasi (Muñoz, 1997).

Les mutacions dels gens que controlen la proliferació cel·lular i la seva localització en un lloc determinat són les que causaran l'aparició de cèl·lules canceroses (veure resum a la Taula 3).

Aquests gens implicats en el cicle cel·lular són:

- **Protooncogens:** de l'expressió gènica⁸ dels protooncogens es produeixen unes proteïnes que regulen la divisió cel·lular. Aquestes proteïnes sintetitzades pels protooncogens participen en el procés de divisió cel·lular de tal manera que estimulen la multiplicació i la proliferació cel·lular (empenyen i ajuden a la divisió de les cèl·lules). Si en aquests gens hi apareix una mutació, poden incrementar la seva funció i estimular encara més el creixement i la multiplicació cel·lulars (Figura

10). La forma mutada dels protooncogenes s'anomenen oncogenes.

- **Gens supressors de tumors:** les proteïnes resultants de la seva expressió tenen la funció de controlar el cicle de divisió cel·lular, evitant el creixement excessiu, és a dir, bloquegen i frenen els cicles quan és necessari per tal d'evitar una proliferació excessiva de cèl·lules. Aquests gens indueixen l'aparició de càncer quan, al mutar, deixen d'expressar-se (i per tant no es produeixen aquestes proteïnes). Llavors és quan poden originar un creixement cel·lular descontrolat.
- **Gens de reparació de l'ADN:** són els responsables d'arreglar els errors produïts durant la replicació de l'ADN, és a dir, de les mutacions. Si aquests gens presenten una mutació poden aparèixer múltiples mutacions a altres gens. Aquests gens que muten posteriorment poden ser protooncogenes o gens supressors de tumors. Com hem explicat anteriorment, les mutacions en aquests gens implica la formació de tumors i el possible increment de la velocitat de creixement del tumor.

Taula 3. Resum dels tres tipus de gens implicats amb el càncer. **Font:** Genes y nuevas terapias; Alberto Muñoz, 1997.

GENS IMPLICATS EN L'APARICIÓ DEL CÀNCER		
Nom	Número aprox.	Mecanismes d'oncogenecitat
Protooncogenes	100	Canvi de funció
Gens supressors de tumors	30	Pèrdua de funció
Gens de reparació del ADN	25-35?	Pèrdua de funció

Entre els protooncogenes i els gens supressors de tumors s'estableix un equilibri, i per tant, si un d'aquests falla, aquest equilibri es trenca (Figura 10). Una mutació en qualsevol dels dos tipus de gens pot tenir una greu afectació alhora del desenvolupament d'un càncer. Així doncs, les investigacions d'avui en dia se centren en trobar nous gens d'aquests tipus i trobar quina és la causa de les seves mutacions.

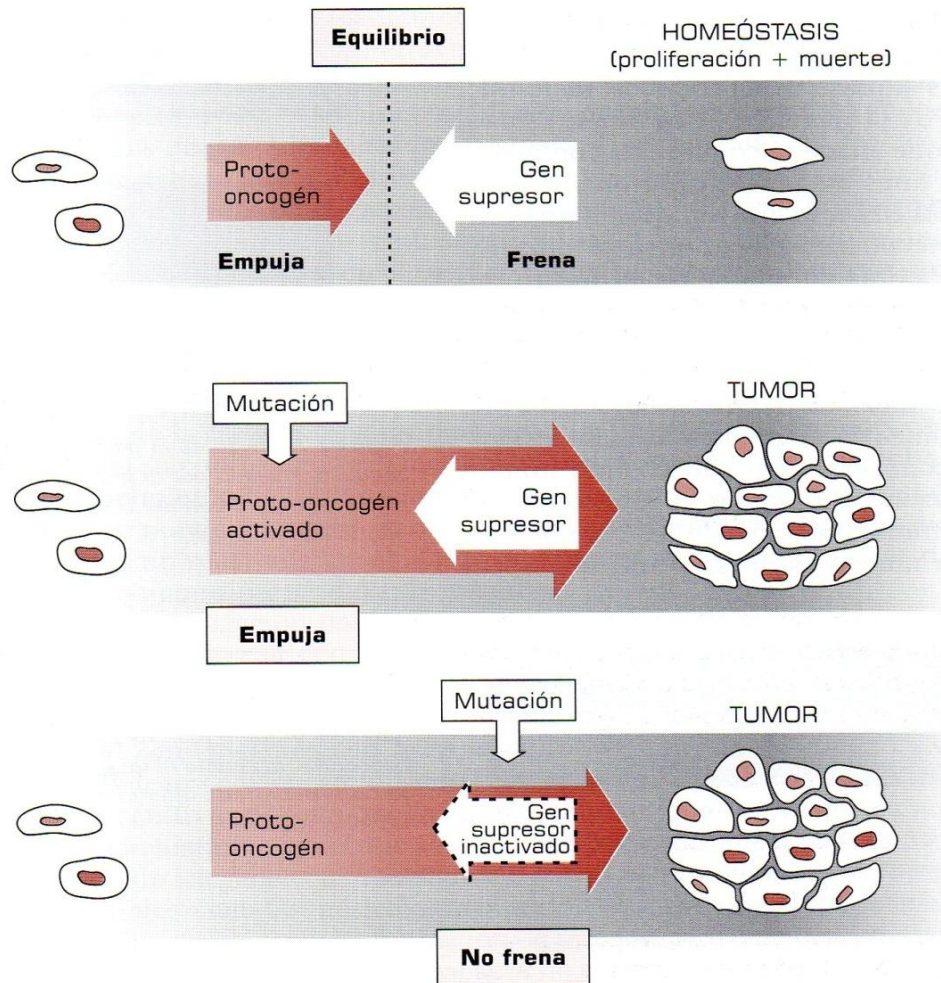


Figura 10. Esquema de les funcions dels protooncogenes i els gens supressors de tumors **Font:** Genes y nuevas terapias; Alberto Muñoz, 1997.

Segons una notícia publicada al diari *El Periódico*, científics de l'Institut d'Investigació Biomèdica (IRB) de Barcelona i de l'Hospital del Mar han trobat una proteïna que encén centenars de gens vinculats amb el creixement tumoral (protooncogenes i gens supressors de tumors). Aquest estudi va ser publicat a la revista *Nature Medicine* aquest mateix any 2012. Aquesta proteïna, en teoria, només la tenim activa en la nostra fase embrionària però en els teixits tumorals també s'hi ha trobat activada (Ortiz-Zapater, et. al, 2012). Aquesta trobada científica permetrà crear tractaments que inhibeixin aquesta proteïna, donant com a resultat una possible reducció de la mida dels tumors a un 80%.

2.5 Protooncogèn KRAS

El gen conegut com KRAS (*-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) és un protooncogèn descobert per Edward Scolnick a finals de la dècada dels setanta. D'aquest gen s'obté una proteïna de membrana anomenada KRAS implicada en el creixement i la diferenciació cel·lular (Muñoz, 1997). Per tant, la mutació d'aquest gen és un pas essencial per a l'aparició de diversos càncers, com per exemple el càncer colorectal, el càncer de pàncrees o el càncer de pulmó, entre d'altres.

Les mutacions del gen KRAS s'han trobat en un 40% dels casos de càncer colorectal. La mutació d'aquest protooncogèn no provoca el càncer, però agreuja la situació d'aquest donant-li capacitat de metàstasi.

Unes de les teràpies per curar el càncer colorectal són les teràpies d'anti-EGFR (Receptor del factor de creixement epidèrmic, que són les inicials en anglès del nom de la proteïna *Epidermic Growth Factor Receptor*). Són fàrmacs que actuen bloquejant la proteïna EFGR present a la membrana cel·lular i no deixen que aquesta s'activi.

La proteïna EGFR quan s'activa provoca la transmissió d'un senyal intercel·lular a través de múltiples proteïnes, entre elles a la proteïna KRAS. Aquest senyal finalment l'envia la proteïna KRAS al nucli. Això provoca un augment de la proliferació de les cèl·lules canceroses i per tant de l'aparició de metàstasi (Figura 11).

Si el gen KRAS no està mutat i per tant la proteïna no està afectada, les teràpies anti-EGFR bloquegen l'activació de l'EGFR i per tant, també aturen el senyal que transmetia el KRAS (Figura 12). D'aquesta manera s'aconsegueix que no continuï la progressió del càncer.

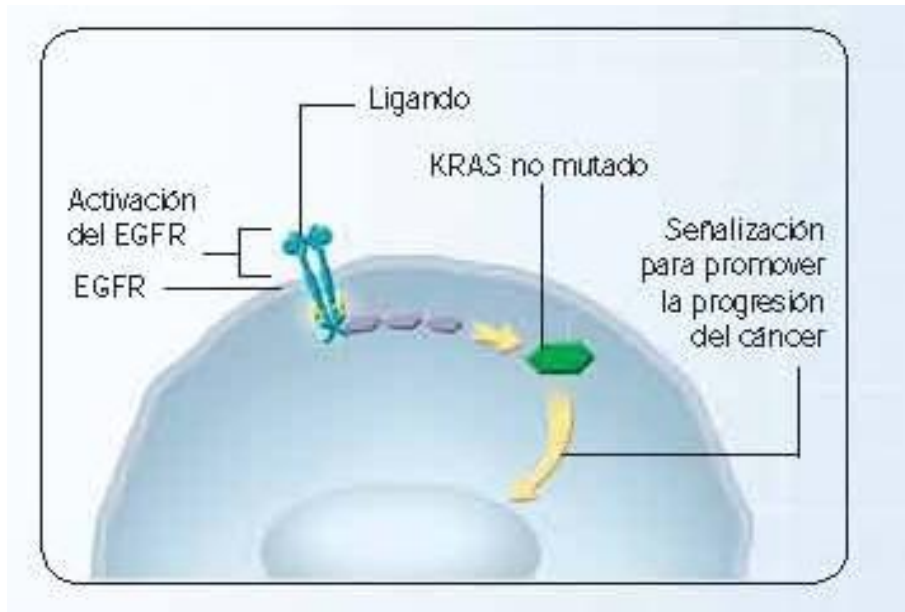


Figura 11. Esquema sobre les conseqüències de l'activació de la proteïna EGFR. **Font:** Amgem Oncologia. *Nuevo biomarcador predictivo en CCRm.*

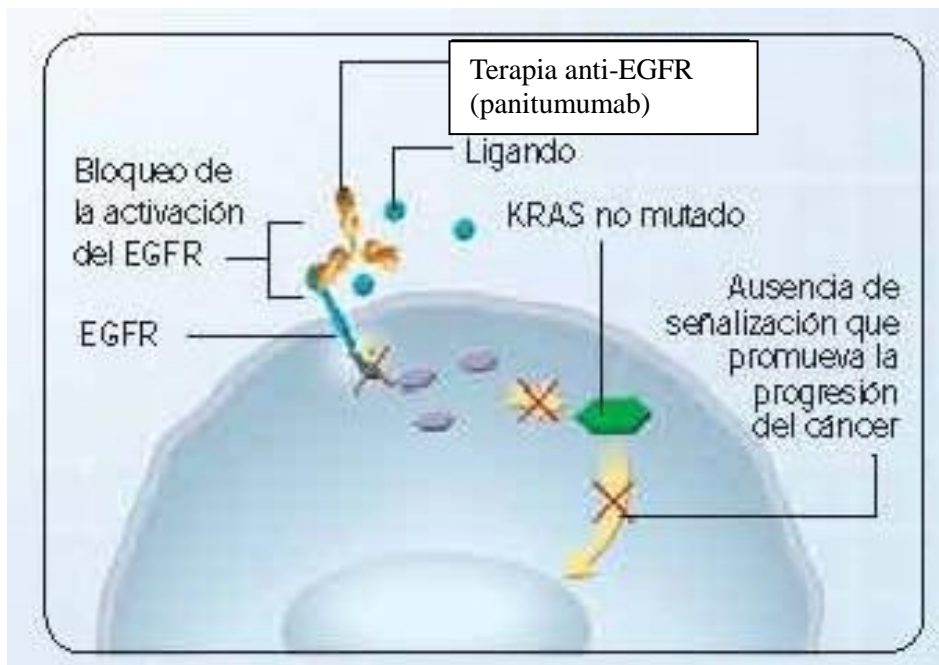


Figura 12. Esquema sobre les conseqüències de la teràpia anti-EGFR en pacients amb KRAS no mutada. **Font:** Amgem Oncologia. *Nuevo biomarcador predictivo en CCRm.*

Malgrat els bons resultats obtinguts en aquests tractaments quan el KRAS no està mutat, l'eficàcia del tractament quan aquest gen sí que està mutat es totalment nul·la.

La proteïna obtinguda del gen KRAS mutat es manté activa constantment transmetent senyals inclús quan el EGFR està inactiu. Per tant, encara que anul·lem la proteïna EGFR, el KRAS no quedarà afectat (Figura 13).

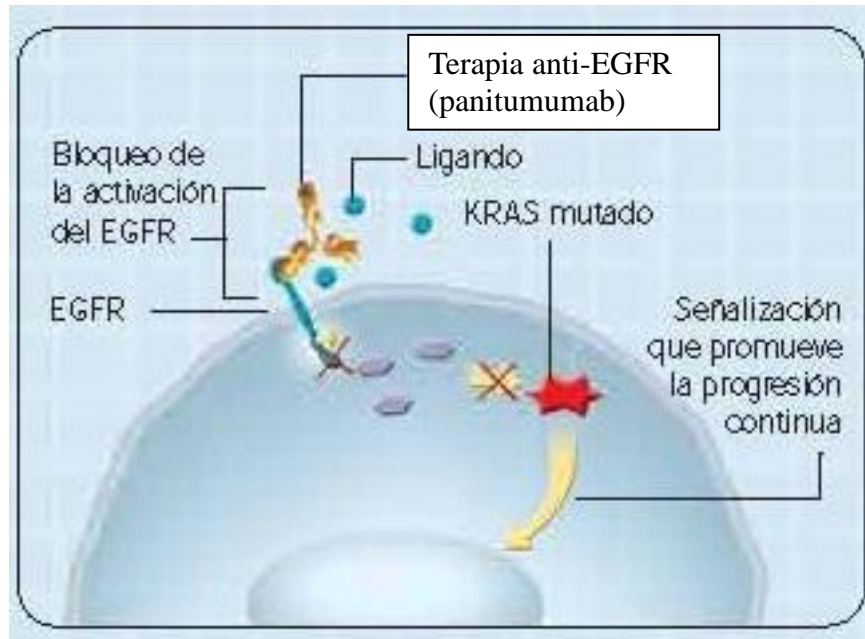


Figura 13. Esquema sobre les conseqüències de la teràpia anti-EGFR en pacients amb KRAS mutat. **Font:** Amgem Oncología. *Nuevo biomarcador predictivo en CCRm.*

Un dels medicaments del tractament anti-EGFR és el Panitumumab. Resultats publicats en el *Journal of Clinical Oncology* (Harari et al., 2007) esmentaven que l'administració d'aquest medicament un cop cada 2 setmanes provoca una millora estadísticament significativa de la supervivència en pacients amb càncer colorectal sense mutació del gen KRAS. En aquests moments queda pendent veure la seva eficàcia en el casos de càncer colorectal amb KRAS mutat.

Així doncs, el coneixement de si el pacient amb càncer colorectal presenta o no la mutació del gen KRAS és molt important en el seguiment i el tractament de la malaltia, ja que en comptes de perdre el temps amb un tractament ineficaç en la població que presenta el

gen mutat, a aquests se'ls pot redirigir cap a teràpies alternatives i més eficaces que estan en estudi. Als pacients que no tenen el gen KRAS mutat es pot anar directament a fer servir la teràpia d'anti-EGFR. Com s'ha mencionat reiteradament, el temps que es triga a iniciar el tractament del càncer és d'una importància cabdal, ja que com més s'espera, més s'agreuja la malaltia.

3. COMPROVACIÓ EXPERIMENTAL DE LA HIPÒTESI. IDENTIFICACIÓ DE LA MUTACIÓ DEL PROTOONCOGÈN KRAS EN UN TEIXIT TUMORAL HUMÀ

3.1 Disseny experimental

Disposem de dos teixits extrets del còlon d'una persona anònima amb càncer colorectal: un pertany al teixit tumoral i l'altre pertany al teixit perifèric (teixit sa) que l'envolta. A través de l'extracció d'ADN i la seva seqüenciació identificaré si hi ha la presència de la mutació de l'oncogèn KRAS al teixit tumoral i poder demostrar que al teixit sa no hi ha cap tipus de mutació.

La *variable independent* de l'experiment és qualitativa, és a dir, tindria només dos valors: teixit tumoral / teixit sa. La *variable dependent* seria també qualitativa: l'existència o no de la mutació del gen KRAS.

Si la meua hipòtesi és certa, el càncer colorectal ha estat agreujat per la mutació del KRAS i per tant, en un teixit tumoral trobarem la mutació d'aquest gen i si el teixit és sa, no hi haurà mutació.

Un aspecte molt important en qualsevol demostració experimental són les rèpliques. A part del primer experiment, jo vaig fer una rèplica, és a dir, vaig fer un segon experiment amb un teixit sa i tumoral de una segona persona anònima. Per validar de manera definitiva la meua hipòtesi i perquè el meu experiment fos científicament rigorós, caldria fer rèpliques en els teixits d'un mateix individu per comprovar que no hi ha hagut cap errada en el procés. Però l'objectiu del meu treball era principalment aprendre la tècnica d'extracció d'ADN del teixit humà, ja que la veritable investigació la duen a terme els metges i científics del laboratori.

També és important el control de la resta de variables. En el meu experiment, per cadascuna de les dues rèpliques que vaig fer, els dos teixits pertanyien sempre a la mateixa persona i a l'hora de fer l'experiment les condicions a les quals es trobaven eren iguals per totes dues mostres. A la PCR d'amplificació i de seqüenciació, tècnica que explicaré més endavant, les condicions que vaig aplicar al termociclador també van ser fixades i per igual en totes dues mostres.

3.2 Extracció d'ADN de teixit colorrectal humà

Material

- 2 mostres de teixits, un de tumoral i l'altre de sa
- Kit de Qiagen (Buffer AW1 Buffer AW2, Buffer AL, Buffer ATL, Buffer AE i proteinassa K) (Figura 14)
- Etanol
- Micropipetes⁹ de 1000µl i 100µl i puntes (Figura 15 A)
- Gradeta
- Dos bisturís
- 2 plaques de petri
- 2 tubs de 1,5 ml
- 1 columna
- Vortex¹⁰ (Figura 15 B)
- Bany termostàtic¹¹ (Figura 15 C)
- Espectrofotòmetre
- Centrífuga¹² (figura 15 D)



Figura 14. Kit Qiagen necessari per fer l'extracció del ADN dels teixits. A part hi trobem l'etanol, les pipetes, i la gradeta amb les mostres. **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball

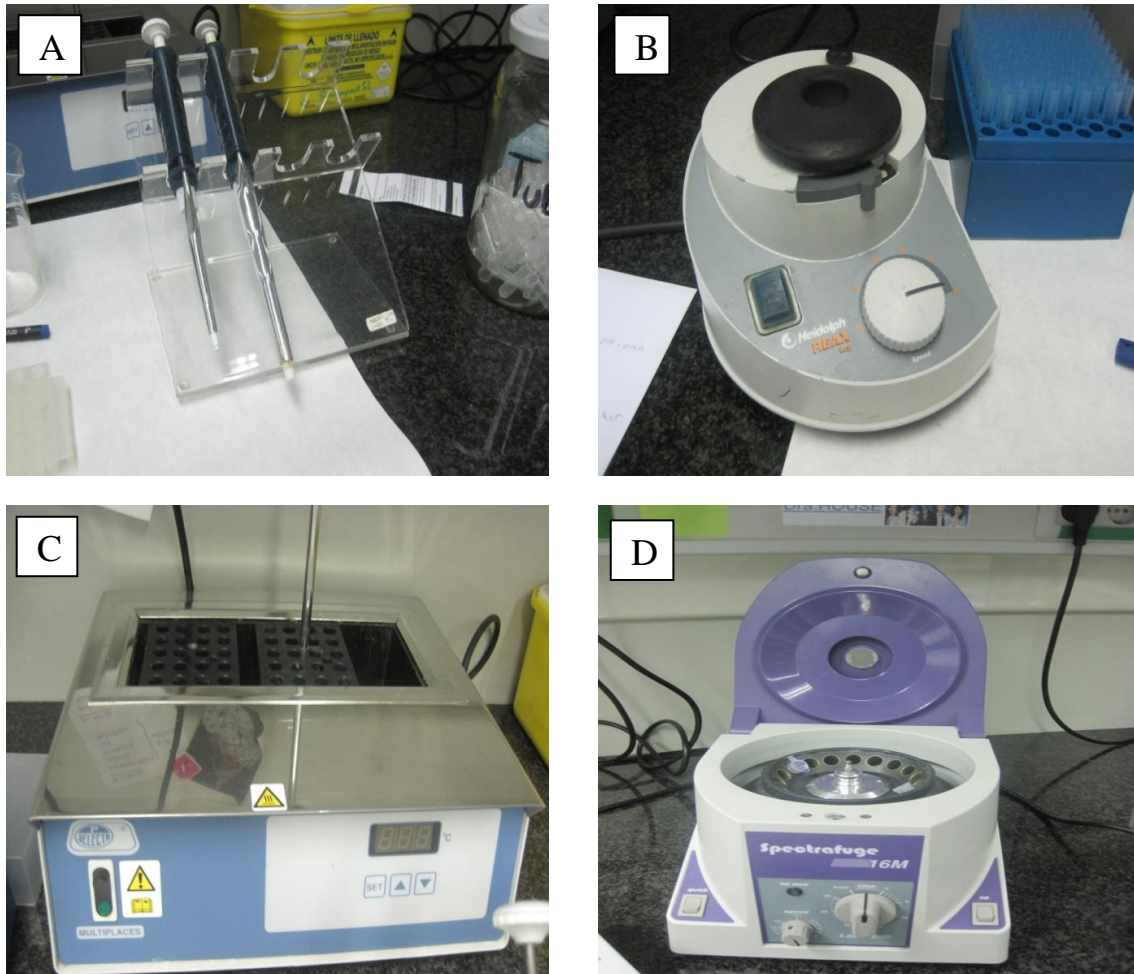


Figura 15. a) Micropipetes de 1000µl i 100µ; b) Vortex; c) Bany termostàtic; d) Centrífuga.

Font: extreta per l'autor d'aquest treball.

Extracció

Disposo de 25 mg de teixit tumoral d'una persona anònima amb càncer colorectal i 25 mg del teixit sa de la mateixa persona que hi ha al voltant del tumor, en dues plaques de petri separadament. El procés d'extracció es fa seguint un protocol específic (**Veure Annex 5**). Primer de tot hem de triturar les mostres amb els bisturís i amb l'ajuda del Buffer ATL (forma part del kit) s'ha d'aconseguir una lisi cel·lular, és a dir, que l'ADN surti del nucli cel·lular per tal de poder aïllar-ne el màxim. Quan el teixit triturat tingui un aspecte homogeni passarem les mostres a dos tubs de 1,5 ml afegint-hi Proteinassa K, un enzim, que trenca les proteïnes de les membranes cel·lulars i per tant ajuda que es produeixi la lisi. Seguidament s'ha d'anar aplicant rentats a l'ADN seguint el protocol fins a aïllar-lo

totalment per aconseguir les dues mostres amb l'ADN diluït, una amb l'ADN extret del teixit tumoral i l'altre, amb l'ADN extret del teixit sa.

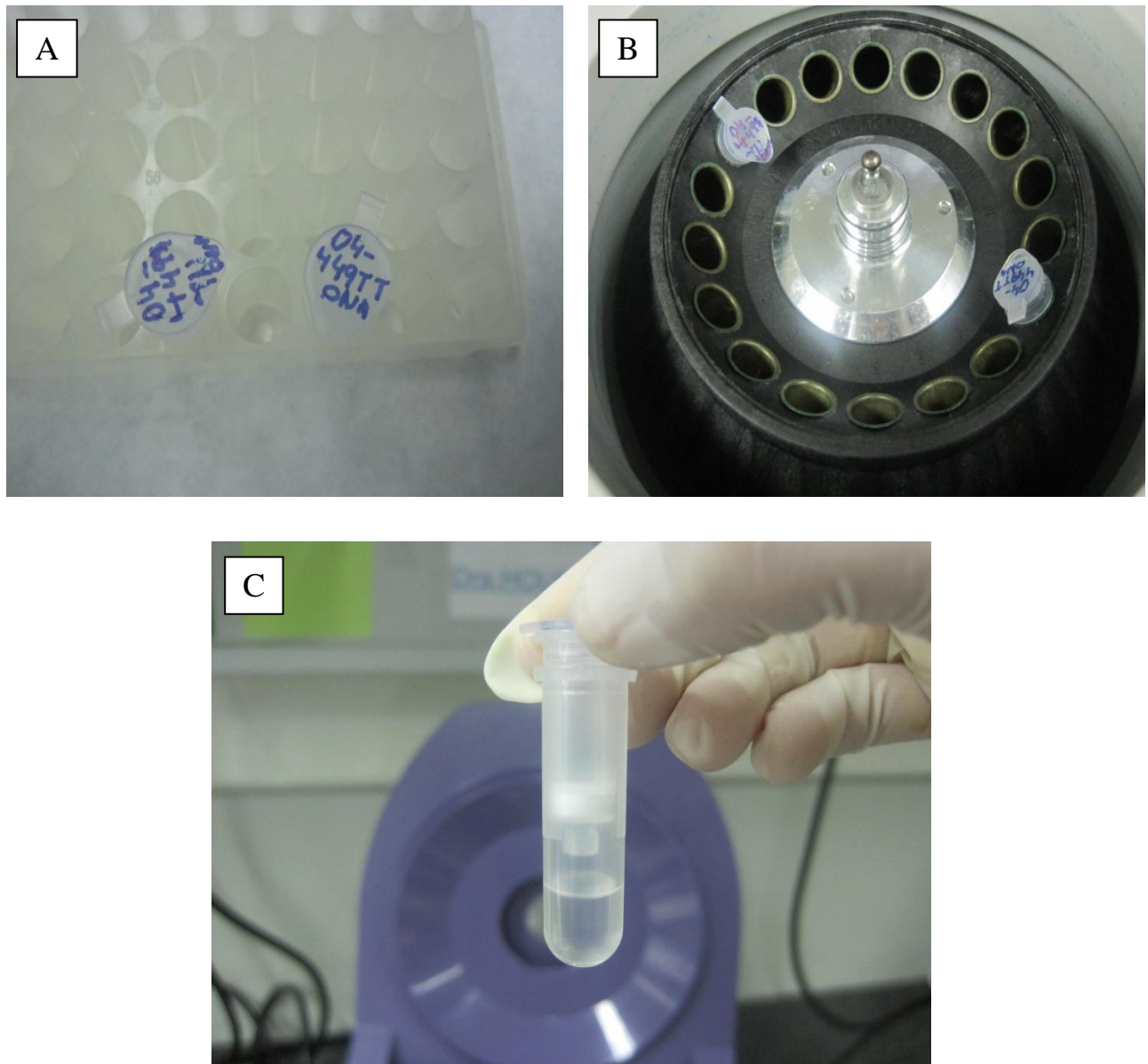


Figura 16. a) Les mostres d'ADN. La mostra 04-449 TN és la corresponent al teixit sa i la 04-449 TT és la corresponent al teixit tumoral; b) Les mostres a la centrifugadora; c) L'ADN ja extret i diluït amb buffer AE. **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball.

Quantificació

Finalment per comprovar que l'extracció s'ha dut a terme correctament i per mirar la concentració d'ADN, quantifiquem les mostres amb un espectrofotòmetre (Figura 17). L'espectrofotòmetre primer s'ha de calibrar amb el mateix producte amb el qual l'ADN està dissolt. Seguidament es posa la mostra a l'espectrofotòmetre. L'espectrofotòmetre incideix

una llum amb una longitud d'ona específica perquè l'ADN l'absorbeixi. L'ADN té l'absorbància màxima 260 nm (nanòmetres) i calculant la quantitat de llum absorbida es pot saber la concentració d'ADN.

Les concentracions d'ADN obtingudes en les mostres que vaig utilitzar en el primer individu, van ser:

- Teixit tumoral: 111 ng/ μ l d'ADN
- Teixit sa: 31 ng/ μ l d'ADN

En el segon individu, van ser:

- Teixit tumoral: 64 ng/ μ l d'ADN
- Teixit sa: 83 ng/ μ l d'ADN

L'espectrometria també s'utilitza per mesurar la puresa de l'ADN, és a dir, per saber si encara té residus que no s'hagin eliminat correctament. El grau de puresa de l'ADN ha d'estar entre 1,8 i 2. Les meves mostres del primer individu estaven a 1,86 (teixit tumoral) i 1,77 (teixit sa). Tot i que el teixit sa no es trobava dins de l'interval de puresa, hi estava molt a prop i no em va impedir que la resta de procediments no sortissin vàlids. Les mostres del segon individu sí que estaven dins de l'interval de grau de puresa, amb valors de 1,88 (teixit tumoral) i 1,82 (teixit sa)



Figura 17. Espectrofotòmetre. **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball

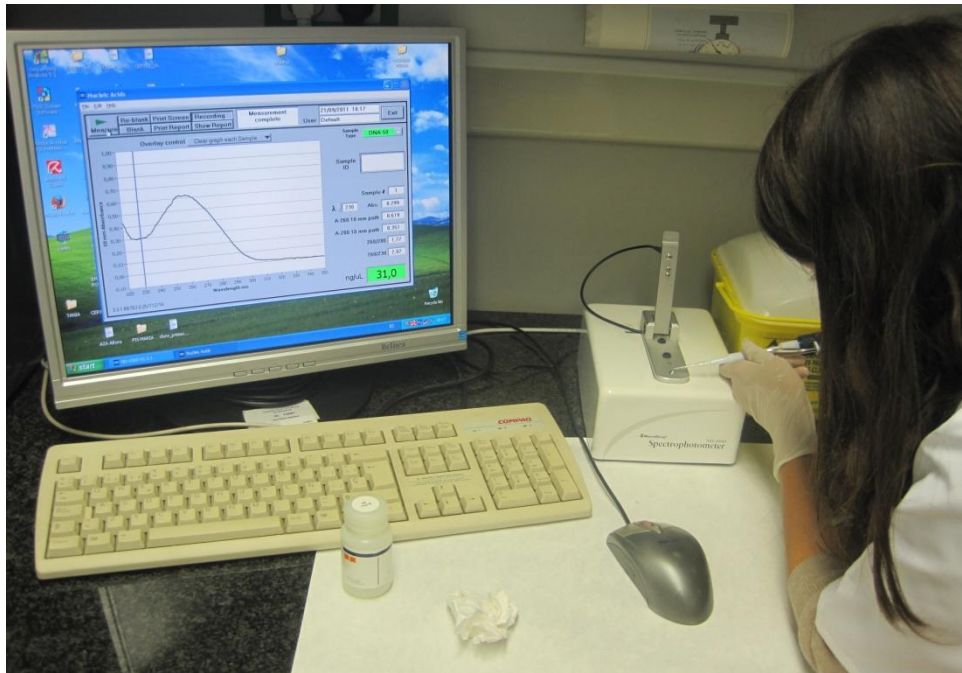


Figura 18. Procés de quantificació de l'ADN mitjançant l'espectrofotòmetre. **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball

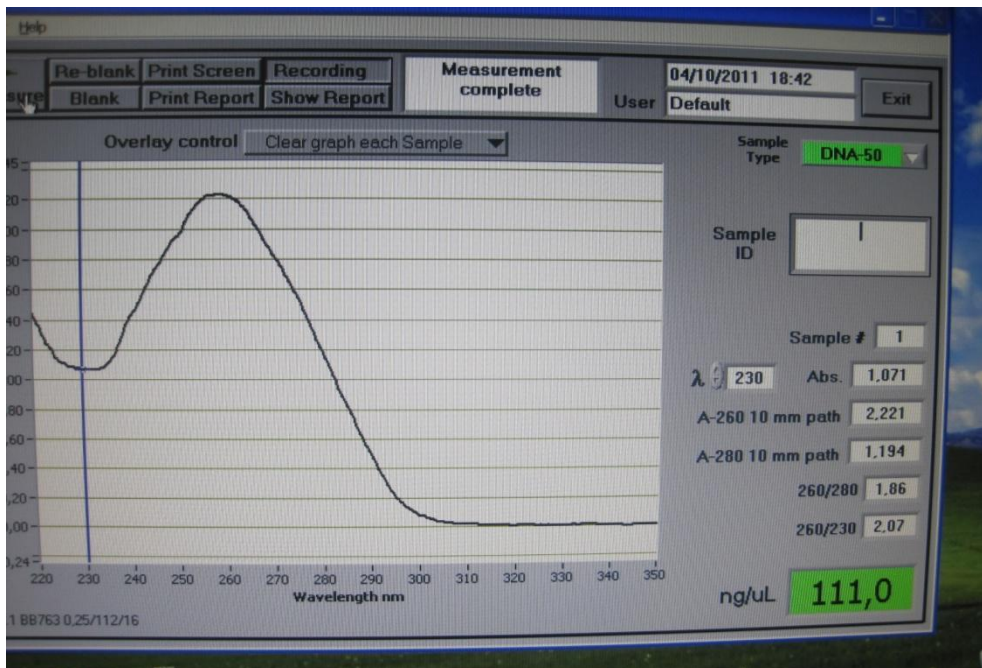


Figura 19. Resultats de la quantificació de la mostra del teixit tumoral del primer individu on es veu la corba d'absorbància de l'ADN (el seu punt màxim es troba en el 260 nm). **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball

3.3 PCR d'amplificació

PCR amplificació (que són les sigles en anglès de Polymerase Chain Reaction: Reacció en cadena de la Polimerasa) és una tècnica de biologia molecular que el seu objectiu és obtenir un gran número de còpies d'un fragment d'ADN particular, partint d'un mínim. Després de l'amplificació resulta molt més fàcil identificar amb una molt alta probabilitat les mutacions que busquem. Amb aquesta tècnica he ampliat el fragment corresponent al KRAS de les mostres d'ADN que teníem del teixit tumoral i del teixit sa per identificar si el gen ha estat mutat o no. Amb la quantitat que teníem inicialment era pràcticament impossible identificar si s'hi havia donat lloc una mutació.

Aquesta tècnica es basa en la propietat natural de l'ADN-polimerasa, un enzim que s'encarrega de la replicació de l'ADN. La replicació és el mecanisme molecular per mitjà del qual l'ADN produeix una còpia de si mateix. Els ADN-polimerases s'uneixen a una cadena motlle d'ADN i la dupliquen ajuntant dNTPs lliures (nucleòtids amb bases nitrogenades complementàries; Adenina-Timina, Guanina-Citocina), creant una nova doble hèlix. La cadena motlle s'obté de la doble hèlix inicial que partíem al principi. Aquesta, en escalfar-se a temperatures molt elevades, se separa en dues cadenes. Per això mateix aquesta tècnica utilitza cicles d'altres i baixes temperatures per separar la doble hèlix de l'ADN i a continuació tornar a crear una nova doble hèlix a partir de l'ADN-polimerasa.

Inicialment aquesta tècnica era lenta, ja que les polimerases es desnaturalitzaven (perden la seva estructura i per tant les seves propietats) a l'arribar a temperatures molt elevades i per tant era necessari agregar noves polimerases a cada cicle. Actualment, s'utilitzen polimerases termoestables, és a dir, extretes de microorganismes adaptats a viure a altes temperatures. En el meu cas he fet servir una ADN-polimerasa extreta d'un bacteri autòtrof anomenat *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq). Aquest bacteri viu en les proximitats de fonts d'aigua calenta, va ser descoberta per Thomas Brock al 1969 en una font del Parc Nacional de *Yellowstone*.

Aquest procés de la PCR d'amplificació es du a terme mitjançant un aparell anomenat termociclador, que permet escalfar i refredar la reacció en cada etapa.

Material

- Kit TaKaRa LA Taq:
 - dNTP (nucleòtids per poder realitzar les cadenes complementàries)
 - buffer (manté constant el pH de la mostra)
 - $MgCl_2$ (Clorur de manganès)
 - ADN-polimerasa (polimerasa Taq)
 - Encebadors o iniciadors (anomenats *primers* en la seva nomenclatura original en anglès): seqüències curtes de nucleòtids que s'enganxen a la cadena motlle delimitant la zona d'ADN a amplificar, és a dir, són cadenes complementàries als extrems de l'ADN.
- Aigua
- 4 tubs de 0,5 ml
- Les mostres d'ADN extretes del teixit tumoral i del teixit sa.
- Micropipetes i puntes
- Vortex
- Gradeta
- Termociclador (Figura 20)



Figura 20. a) i b) Termociclador. **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball.

Preparació

Abans de posar les mostres al termociclador, hem de preparar-les perquè es pugui dur a terme la PCR, és a dir, hem d'introduir els productes del Kit TaKaRa LA Taq a les mostres. A més, al termociclador hi introduïrem un tub que contindrà aigua per fer-lo servir de control, és a dir, per mirar més endavant si les mostres han estat contaminades. A cada tub hi aniran les següents quantitats:

- 1,6µl de dNTPs
- 1µl de buffer
- 1µl de MgCl₂
- 0,1µl Taq (ADN-polimerasa)
- 0,2µl Primer forward (encebador que indica on començar a replicar)
- 0,2µl Primer revers (encebador que indica on s'acaba la replicació)
- 3,4µl d'Aigua
- 2,5µl d'ADN extret

En total tindrem un volum de 10µl per mostra. Prepararem un tub amb tots els reactius excepte l'ADN que el ficarem al final, degut al fet que en un tub posarem l'ADN tumoral i en un altre tub hi posarem l'ADN sa, per tant variarà d'una mostra a l'altre. També inclourem un tercer tub on en comptes d'ADN ficarem aigua miliQ (aigua molt pura) que ens servirà de control per comprovar que cap dels reactius de la PCR es troba contaminat. Les contaminacions poden influenciar en els resultats finals.

Quan ja tinguem preparades les mostres les hem d'introduir al termociclador per començar la PCR d'amplificació. Però abans de començar-la hem d'establir les condicions en les quals tindrà lloc la PCR. Aquestes condicions depenen dels encebadors que hem introduït pel gen KRAS i de l'ADN-polimerasa que hem fet servir, en aquest cas, la Taq.

- durant 1' → a 94°C
 - durant 30" → a 94°C
 - durant 1' → a 60°C
 - durant 1' → a 72°C
 - durant 10' → a 72°C
- } aquestes 3 etapes es repetiran durant 28 cicles

- Fins que es treguin les mostres del termociclador → a 4°C

Quan ja hem introduït les mostres al termociclador, i la informació anterior de les condicions del procés, ja es pot dur a terme la PCR d'amplificació.

Procediment (Figura 21)

- *Iniciació*: aquest pas es du a terme a una temperatura de 94°C durant 1' per activar els ADN-polimerases.
- *Desnaturalització*: l'ADN motlle es desnaturalitza (se separen les dues cadenes del qual està constituït). Aquest pas es troba a 94°C durant 30".
- *Alineament*: En aquest pas, l'encebador s'unirà a la seva seqüència complementària de l'ADN motlle a través de ponts d'hidrogen (enllaços) en els extrems del gen que busquem, és a dir, el KRAS. Aquest procés s'ha de dur a terme a 60°C ja que aquesta temperatura és específica per els encebadors que estem emprant pel KRAS.
- *Elongació de la cadena*: L'ADN-polimerasa comença a sintetitzar la cadena complementària partint de l'encebador en direcció 3'→5' . L'ADN-polimerasa va ajuntant els dNTPs subministrats creant una nova cadena. La temperatura corresponent en aquest pas és de 72°C i es manté durant 1' ja que aquesta és la temperatura ideal per l'ADN-polimerasa. Aquest ADN-polimerasa para de sintetitzar la cadena quan arriba a l'encebador que s'havia unit al final del gen que busquem, el KRAS.

Els tres passos anteriors es repeteixen durant 28 cicles. Aquestes repeticions de cicles de temperatures les fa automàticament el termociclador gràcies a l'ajut d'un programador que disposa l'aparell.

- *Elongació final*: És una etapa única en la qual les mostres es troben a 72°C durant 10' per assegurar que el fragment d'ADN que pertany al gen KRAS ha estat totalment ampliat.

- *Conservació*: Aquesta etapa es du a terme per si vols deixar la mostra reposar fins que més endavant l'hagis d'utilitzar. Les mostres es deixen a 4°C per conservar-les.

Amb aquest procediment aconseguirem tenir moltes còpies del gen KRAS de les nostres mostres d'ADN, i per tant així resultarà més fàcil a l'hora que s'hagin de seqüenciar.

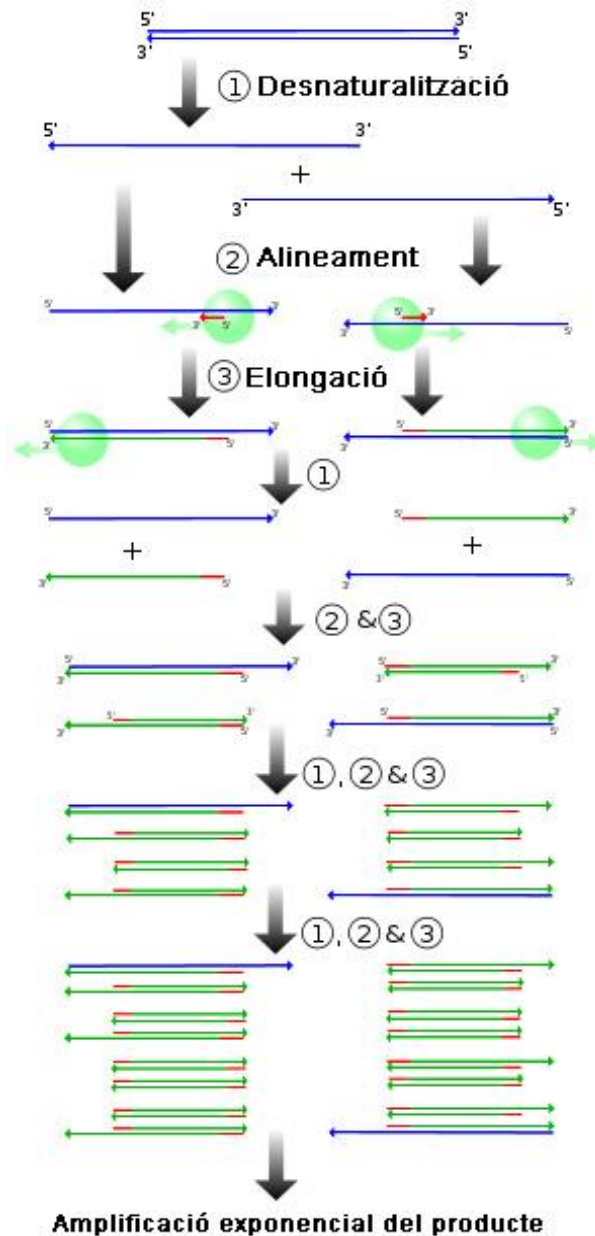


Figura 21. Procés de la PCR. **Font:** Viquipèdia: Reacció en cadena de la polimerasa: http://ca.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3_en_cadena_de_la_polimerasa

3.4 Visualització mitjançant electroforesi en gel d'agarosa

Aquest procés és per comprovar que l'ADN amplificat és realment el que desitjaven, és a dir, el gen KRAS i no un altre fragment. Per comprovar-ho es fa una electroforesi en gel d'agarosa.

L'electroforesi és una tècnica habitual en el laboratori clínic. Permet separar els àcids nucleïcs al llarg d'un gel en funció de la seva grandària i de la seva càrrega elèctrica. Els àcids nucleïcs com l'ADN amb el qual estem treballant, té per naturalesa càrrega negativa. Si posem els fragments de l'ADN extrets de les mostres sobre un suport porós (gel) i apliquem un camp elèctric, es produirà la migració diferencial dels fragments a través dels porus del gel. Aquest gel està tenyit amb bromur d'etidi, que és una substància fluorescent que s'intercala en la molècula d'ADN, per això s'ha de tenir molt en compte ja que si entra en contacte amb la teva pell pot produir danys en l'ADN. Aquesta tinció juntament amb l'exposició amb llum ultraviolada, permet observar el resultat d'aquesta migració.

El gen KRAS degut al seu pes molecular es situarà en un lloc concret del gel. Aquesta posició ja està determinada, així doncs quan veiem els resultats de l'electroforesi els compararem amb el patró de bandes que s'obté de marcadors comercials. Depèn d'on estigui situada la ratlla de les nostres mostres sabrem si realment és el KRAS o no.

Preparació del gel

Primer de tot s'hi aboquen en un matràs 30 ml del tampó d'electroforesi TBE al 10% i 0,30g d'agarosa (1%). Seguidament s'escalfa la solució fins que l'agarosa es dissol, amb l'ajuda d'un microones, i es deixa refredar la mescla fins que aconsegeixi uns 50°C, aproximadament.

El suport on es va a abocar el gel d'agarosa es segella amb cinta adhesiva i es col·loca la cinta que servirà per formar els pouets del gel, és a dir, els forats per on s'introduiran les mostres (Figura 22).

Una vegada que la solució d'agarosa ha aconseguit els 50°C, se li afegixen 7 µL de bromur d'etidi (10 mg/ml) i es barreja bé. Aquesta solució s'aboca en el suport, prèviament segellat. Es deixa gelificar durant uns 30 minuts. Un cop gelificat, s'introdueix a la cubeta d'electroforesi, és a dir, on es produirà el camp magnètic i permetrà la migració de l'ADN.

Finalment es carreguen les mostres al gel incloent la mostra d'aigua que vam fer servir de control a la PCR i es connectarà la cubeta d'electroforesi a una font d'alimentació que genera el camp elèctric.

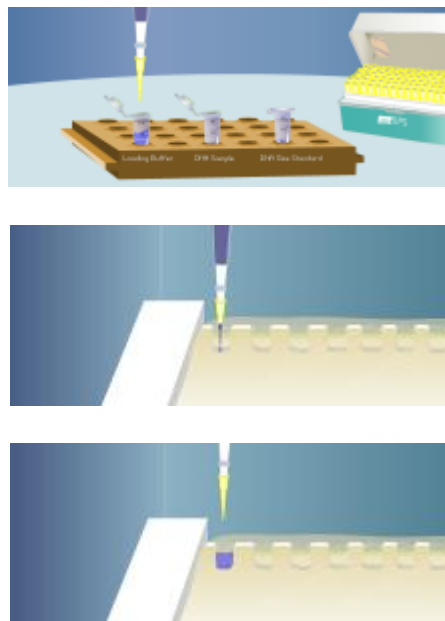


Figura 22. Procediment de l'electroforesi en gel d'agarosa on es veuen els peuetes per on s'introdueixen les mostres. **Font:** Imatge subministrada per Rut Tejero.

Resultats de l'electroforesi

Com podem veure a la Figura 23 i 24, les primeres ratlles mostren els diferents pesos moleculars. La següent ratlla de cada imatge és la corresponent al teixit sa i la de més a la dreta, al teixit tumoral. Com podem observar, es troben les dues situades en el mateix nivell i aquest correspon al pes molecular del KRAS.

Així doncs podem afirmar que la PCR s'ha dut a terme de forma correcta i realment s'ha amplificat el gen desitjat, és a dir, el KRAS.

Si ens hagués sortit una quarta columna amb una ratlla a cada una de les imatges significaria que les mostres estan contaminades. En aquella posició és per on vam fer córrer l'aigua que vam fer servir de control a la PCR.



Figura 23. Resultats de l'electroforesi en el primer individu. **Font:** imatge extreta per l'autor d'aquest treball amb l'ajut de Rut Tejero.

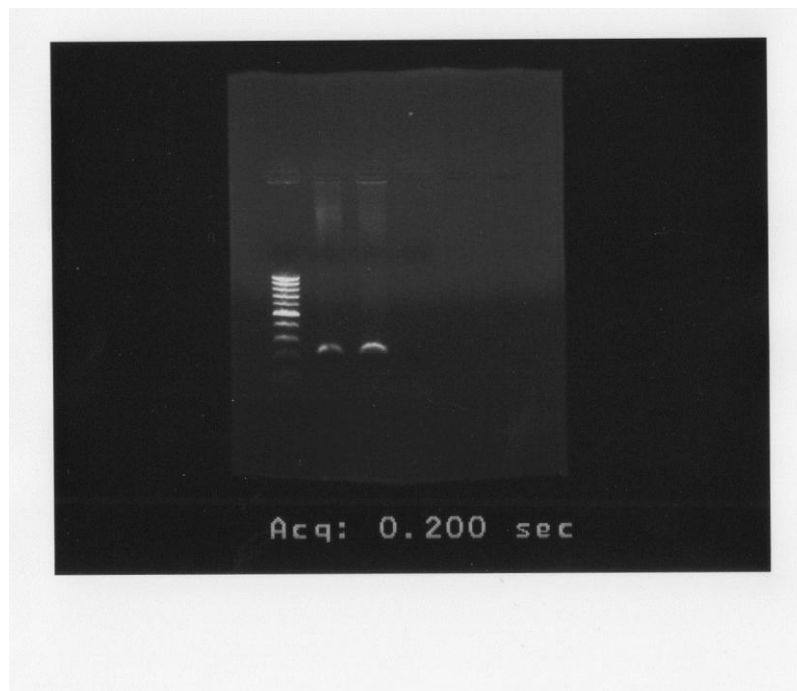


Figura 24. Resultats de l'electroforesi del segon individu. **Font:** imatge extreta per l'autor d'aquest treball amb l'ajut de Rut Tejero.

3.5 Purificació de l'ADN

Material

- kit: MinElute Reaction Cleanup Kit de QIAquick
- 1 columna
- 3 tubs
- centrífuga
- vortex
- pipetes

Procediment

Aquest pas és per obtenir l'ADN el més net possible després de fer la PCR d'amplificació i l'electroforesi. Després de dur a terme aquest procediment es pot obtenir l'ADN de les dues mostres preparades per fer la seqüenciació. Això serveix per eliminar els *primers*, els nucleòtids, l'ADN-polimerasa i tots els productes introduïts anteriorment a les mostres per la PCR d'amplificació.

El procediment a seguir és un protocol (**Veure annex 6**) de purificació de mostres de PCR de *QIAquick*. Es tracta d'un seguit de passos que fan un rentat de l'ADN, s'han d'anar afegint buffers i productes de rentat i seguidament aplicar-hi una centrífuga. Aquests passos es van repetint fins que finalment les mostres queden completament purificades.

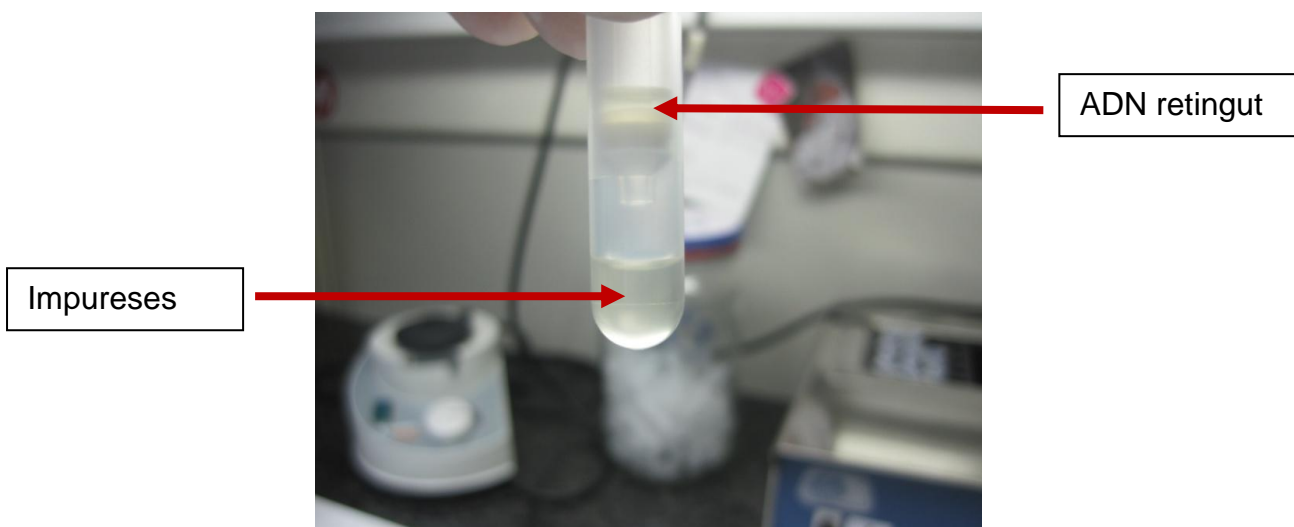


Figura 25. Purificació de l'ADN. Es pot veure com les impureses es filtren a través de la columna i es dipositen a la part de sota. A la part de dalt hi ha l'ADN purificat. **Font:** extreta per l'autor d'aquest treball.

3.6 PCR de seqüenciació o terminació de la cadena

El mètode de terminació de la cadena va ser desenvolupat per Sanger el 1975 i va resultar molt eficient ja que es va poder seqüenciar per primera vegada el genoma¹³ d'un bacteri.

Aquest mètode és semblant a la PCR d'amplificació ja que també es tracta de replicar el ADN afegint-hi ADN-polimerasa i dNTPs a les mostres. Però en aquests cas s'hi ha d'afegir ddNTPs (didesoxinucleòtids fluorescents), a aquests nucleòtids els falta un grup -OH (grup hidroxil) que es necessita per formar un enllaç entre dos nucleòtids (fosfodièster). Per tant quan l'ADN-polimerasa estigui replicant la cadena motlle i introdueixi un ddNTP, en comptes d'un dNTP, aquesta cadena ja haurà acabat la seva replicació i per tant, la seva extensió.

Així doncs els que obtindrem seran molts fragments de l'ADN de les mostres de diferents longituds on al final de cadascun d'ells hi haurà un ddNTP fluorescent. És a dir, tindrem fragments de 20 nucleòtids, de 26 nucleòtids, de 40... Però en tindrem totes les longituds possibles.

Material

- Mostres d'ADN extret del teixit sa i del tumoral
- BigDie:
 - ADN-polimerasa (Taq)
 - dNTPs
 - ddNTPs
- Buffer
- *Primer forward* (encebador que indica el començament del procés de replicació)
- pipetes
- termociclador
- 2 tubs

Preparació

Abans d'introduir les mostres al termociclador, les hem de preparar perquè es pugui dur a

terme la PCR de seqüenciació. Així doncs, a cada tub hi introduïrem:

- 2µl de mostra d'ADN, un tub serà el ADN tumoral i l'altre l'ADN sa.
- 2µl de BigDie
- 2µl de buffer
- 4µl de l'encebador (*primer forward*)

En total tindrem un volum de 10µl per cada tub i aquests ja podran posar-se dins del termociclador. Com en la PCR d'amplificació hem d'establir les condicions amb les quals es durà a terme la PCR de seqüenciació en el termociclador:

- Durant 1' → a 96°C
 - Durant 10" → a 96°C
 - Durant 5" → a 50°C
 - Durant 4' → a 60°C
- } aquests 3 passos es repeteixen durant 25 cicles
- finalment es deixa a 4°C fins que es treuen les mostres del termociclador

Procediment

El procés és pràcticament igual que el de la PCR d'amplificació, es tracta d'anar desnaturalitzant l'ADN i replicant-lo fins a obtenir molts fragments d'ADN de diferents longituds del gen KRAS.

La temperatura que s'aplica al principi durant 1' que és de 96°C. Aquesta temperatura és per activar els ADN-polimerases. Dins dels 25 cicles trobem el primer pas, que és a 96°C durant 10" per desnaturalitzar l'ADN, seguidament durant 5" el termociclador ha d'estar a 50°C perquè és la temperatura específica perquè els encebadors s'enganxin correctament a l'ADN. Finalment l'última etapa es prolonga durant 4' a una temperatura de 60°C perquè es dugui a terme la replicació.

Després d'haver dut a terme la PCR de seqüenciació ja tindrem les mostres preparades per seqüenciar-les, mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida.

3.7 Seqüenciació de l'ADN

Les molècules resultants de la PCR de seqüenciació ara han de ser llegides per poder identificar tota la cadena i així trobar si hi ha una mutació

Aquest procés es dur a terme amb una electroforesi amb gel d'acrilamida. Tot i que el sistema és semblant a l'electroforesi d'agarosa, aquest és un procés complex i no el vaig dur a terme en el laboratori, sinó que les mostres van ser enviades a un centre especial del Clínic on van ser revelades.

L'electroforesi amb gel d'acrilamida, igual que amb el gel d'agarosa, es basa en ordenar per mides els fragments d'ADN obtinguts a la PCR. L'ADN té càrrega negativa i aquest es fa córrer per un gel d'acrilamida, ja que té càrrega positiva. Els fragments més grans, i per tant, amb més pes molecular, quedaran atrapats al gel abans que els fragments més petits, que arribaran quasi al final. Així doncs, obtindrem per ordre els fragments d'ADN amb l'últim nucleòtid fluorescent (Figura 26)

La utilització del marcatge fluorescent permet la detecció de la seqüència d'ADN encara que l'únic nucleòtid marcat sigui l'últim de cada fragment. Com que tenim tots els fragments possibles, també tindrem tots els nucleòtids fluorescents marcats amb fluorescència.

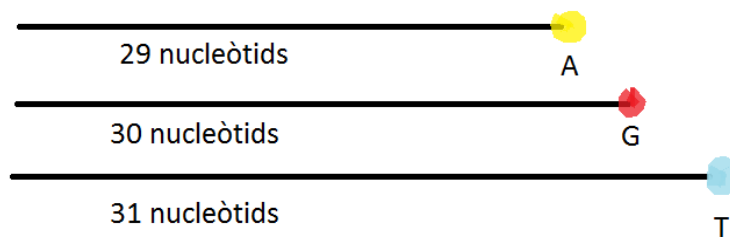


Figura 26. Ordenació de fragments d'ADN per longituds mitjançant l'electroforesi en gel d'acrilamida. **Font:** Realitzada per l'autor d'aquest treball.

4. RESULTATS

Un cop seqüenciades les mostres per la unitat de seqüenciació de l'Hospital Clínic de Barcelona, vam poder comparar-les amb el patró de la seqüència descrita de KRAS (**Veure Annex 7**). A les figures 27, 28, 29 i 30, els pics de color verd, representen l'adenina; els de color vermell, la timina; els de color blau, la citosina i els de color negre, la guanina.

4.1 Individu A

SEQÜÈNCIA (teixit sa):

TCATTTTATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAA/ATG/ACT/GAA/TAT/AAA/CTT/GTG/GTA/
GTT/GGA/GCT/GGT/GGC/GTA/GGC/AAG/AGT/GCC/TTG/ACG/ATA/CAG/CTA/ATT/CAG
/AAT/CAT/TTT/GTG/GAC/GAA/TAT/GAT/CCA/ACA/ATA/GAG/GTA/AAT/CTT/GTT/TTA/AT
A/TGC/ATA/TTA/CTG/GTG/CAG/GACCATTCT

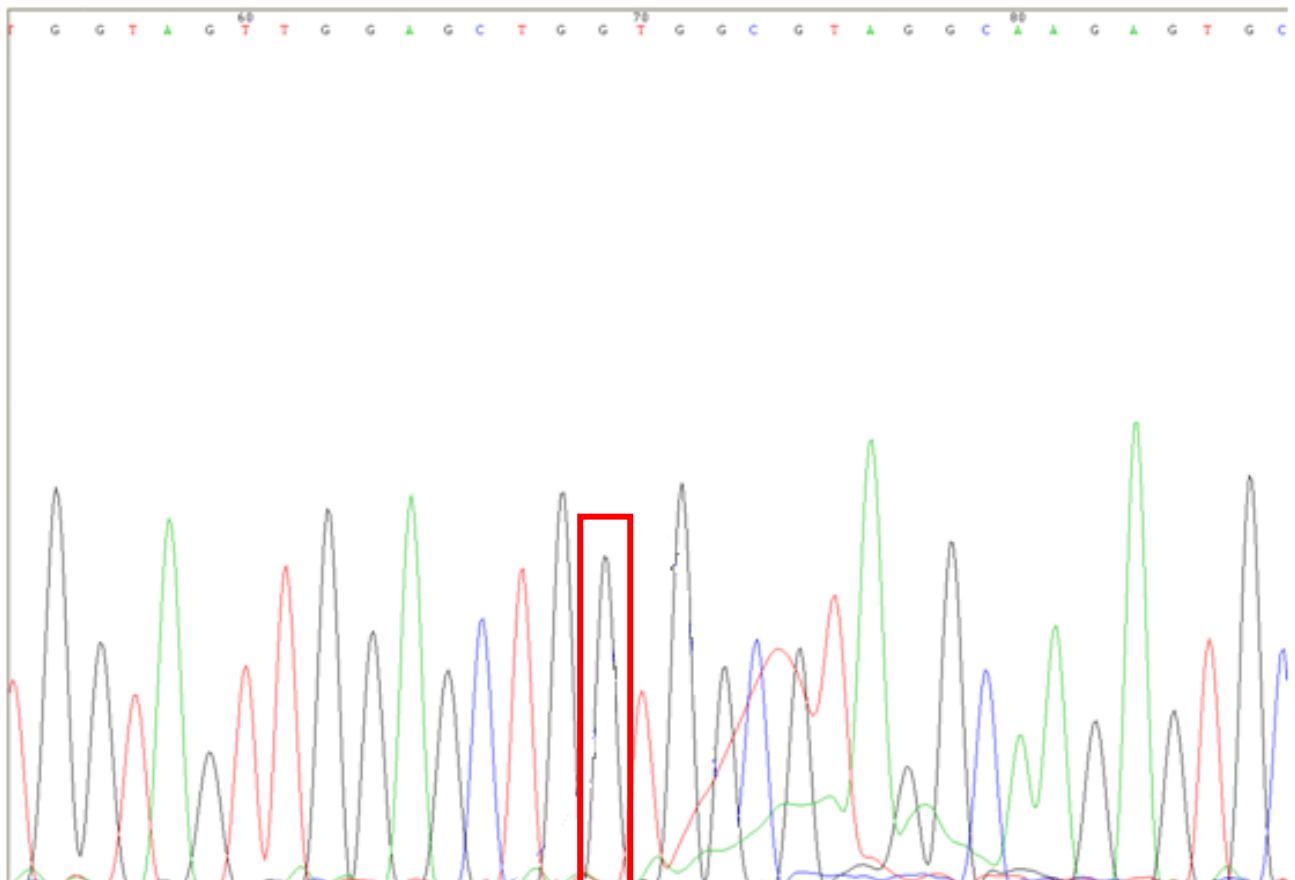


Figura 27. Resultats seqüenciació en el teixit sa de l'individu A. El rectangle vermell marca la timina on hi hauria d'haver una mutació. **Font:** Departament de seqüenciació de l'Hospital Clínic.

Discussió dels resultats

En el codó (3 nucleòtids) dotze és on hi hauria d'haver la mutació del KRAS, concretament en la segona guanina d'aquest codó. Si busquem el codó dotze (marcat en groc) a la seqüència començant a comptar des del primer codó (marcat en blau), trobem que hi ha GGT (guanina, guanina, timina). A la Figura 27 el pic negre marcat amb el quadre de color vermell és una guanina corresponent a la segona del codó dotze. Si comparem aquesta seqüència amb el patró establert del KRAS, trobem que no hi ha cap canvi. El KRAS no mutat presenta GGT en el codó dotze.

Així doncs, l'individu A no presenta cap mutació en el teixit sa.

SEQÜÈNCIA (teixit tumoral):

TTCAGTTTTATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAA/ATG/ACT/GAA/TAT/AAA/CTT/GTG/GTA/GTT/GGA/GCT/GYT/GGC/GTA/GGC/AAG/AGT/GCC/TTG/ACG/ATA/CAG/CTA/ATT/CAG/AAT/CAT/TTT/GTG/GAC/GAA/TAT/GAT/CCA/ACA/ATA/GAG/GTA/AAT/CTT/GTT/TTA/ATA/TGC/ATA/TTA/CTG/GTG/CAG/GACCATTCTA

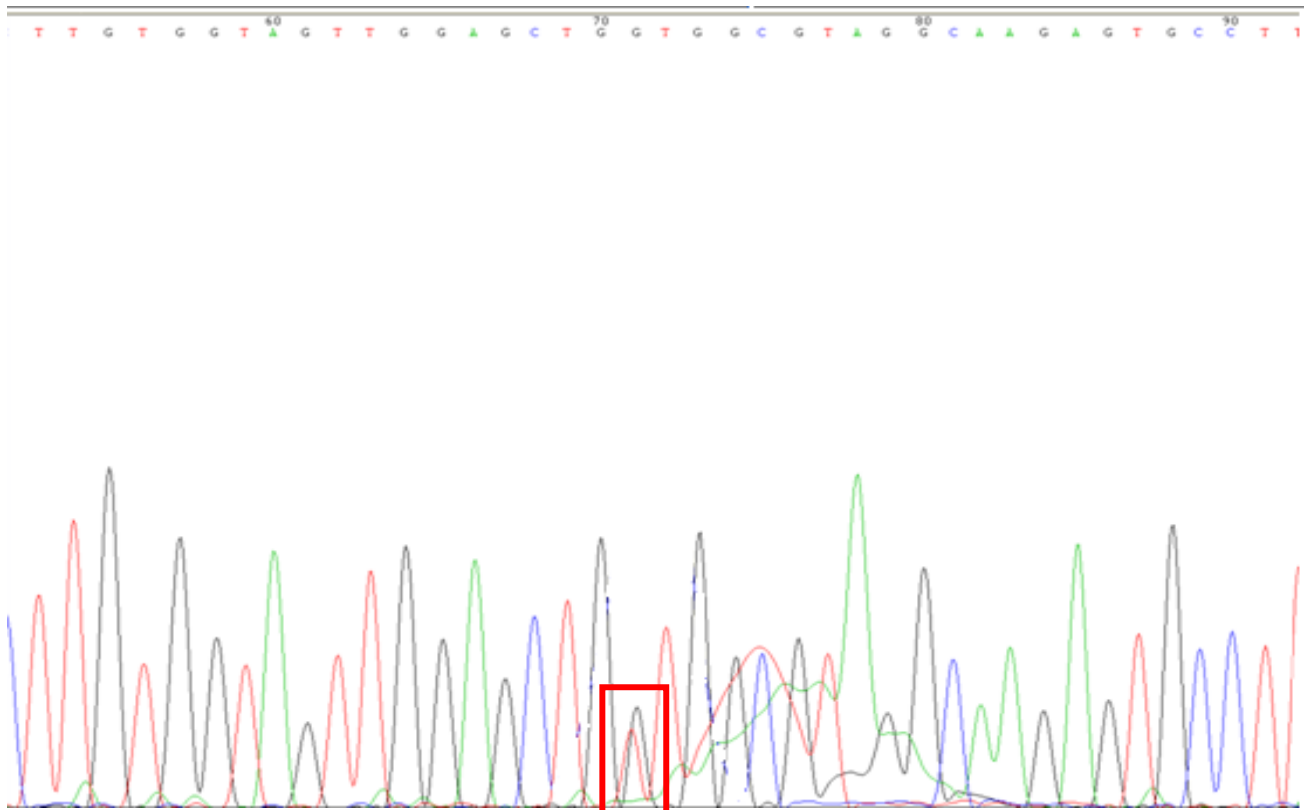


Figura 28. Resultats seqüenciació en el teixit tumoral de l'individu A. El rectangle vermell marca la mutació del KRAS. **Font:** Departament de seqüenciació de l'Hospital Clínic.

Discussió dels resultats

Si llegim el codó dotze (marcat de color) a la seqüència trobem que diu GYT. Això és degut al fet que la màquina de seqüenciació no sabia què anava exactament en aquella posició.

Si observem la Figura 28, en el codó dotze on hi hauria d'haver només un pic negre amb una guanina, no hi és, sinó que hi ha dos pics, un negre i un vermell, és a dir, hi ha dos nucleòtids (rectangle vermell) en la mateixa posició, timina i guanina.

La presència de dos nucleòtids significa que encara que fos teixit tumoral hi havia restes de cèl·lules sanes. En els altres codons no hi ha diferència entre teixit sa i teixit tumoral ja que els nucleòtids que hi corresponen són els mateixos. Però en el codó dotze trobem guanina, corresponent a les cèl·lules sanes. Però com hem observat anteriorment, en el teixit sa, al codó dotze hi hauria d'haver GGT.

Però també hi trobem timina en la mateixa posició i això significa que en el material genètic de les cèl·lules tumorals, en el codó dotze, tenen GTT.

Si comparem el codó dotze de la seqüència obtinguda del material genètic de les cèl·lules tumorals amb el patró del KRAS observem que en comptes d'haver-hi GGT hi ha GTT.

Així doncs l'individu A, presenta la mutació del KRAS en les cèl·lules tumorals

Nota: Podríem pensar que el que ha passat realment és que la mutació ha sigut a nivell d'afegir un nucleòtid de més. Però aquesta idea es descarta ja que si hagués tingut un nucleòtid de més, el fragment d'ADN del teixit tumoral hagués tingut més pes molecular. Per tant, a l'hora de fer la seqüenciació en gel d'acrilamida aquest fragment s'hagués quedat més endarrere i per tant, no el trobaríem en la mateixa posició que el fragment d'ADN del teixit sa.

4.2 Individu B (rèplica 1)

SEQÜÈNCIA (teixit sa):

TCATTTTATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAA/ATG/ACT/GAA/TAT/AAA/CTT/GTG/GTA/
 GTT/GGA/GCT/GGT/GGC/GTA/GGC/AAG/AGT/GCC/TTG/ACG/ATA/CAG/CTA/ATT/CAG
 /AAT/CAT/TTT/GTG/GAC/GAA/TAT/GAT/CCA/ACA/ATA/GAG/GTA/AAT/CTT/GTT/TTA/AT
 A/TGC/ATA/TTA/CTG/GTG/CAG/GACCATTCT

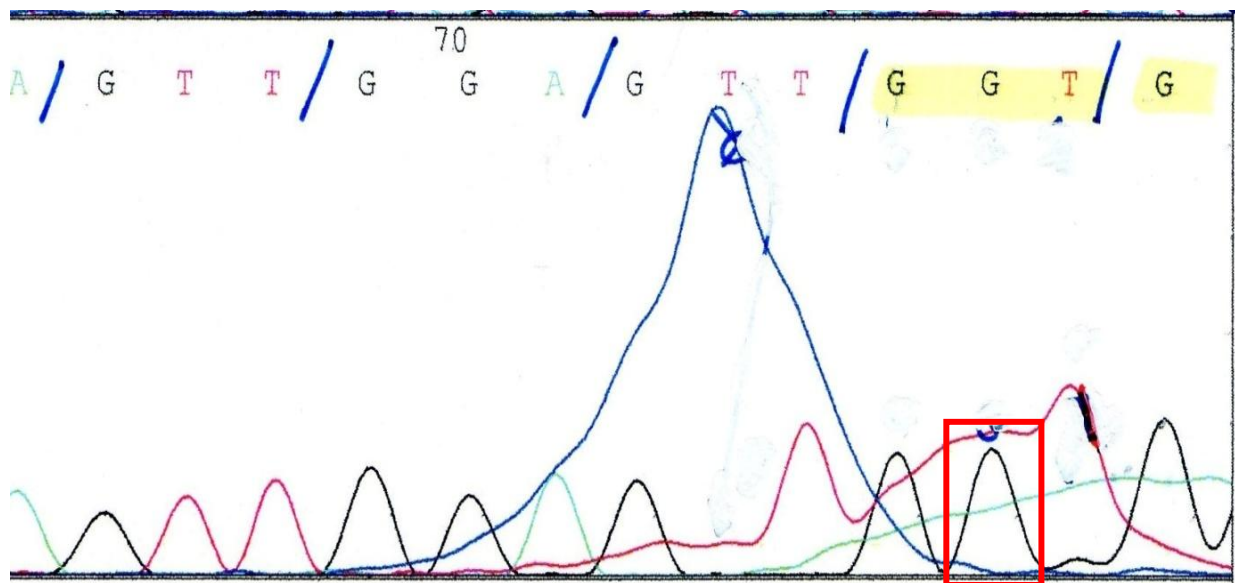


Figura 29. Resultats seqüenciació en el teixit sa de l'individu B. El rectangle vermell marca la presència de guanina. **Font:** Departament de seqüenciació de l'Hospital Clínic.

Discussió dels resultats

Si llegim la seqüència obtinguda, en el codó dotze hi trobem GGT. Si mirem la Figura 29, també trobem efectivament que hi ha una guanina (rectangle vermell).

Si comprarem aquesta seqüència resultant amb el patró de la seqüència del KRAS veiem que GGT és el que correspon.

Així doncs, l'individu B no presenta cap mutació en el teixit sa.

Nota: El pic anterior, de color blau, podria semblar una mutació, però és un pic de brutícia causat per la màquina de seqüenciació o simplement una errada en el procediment de la meva pràctica.

SEQÜÈNCIA (teixit tumoral):

TCATTTTATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAA/ATG/ACT/GAA/TAT/AAA/CTT/GTG/GTA/
 GTT/GGA/GCT/GGT/GGC/GTA/GGC/AAG/AGT/GCC/TTG/ACG/ATA/CAG/CTA/ATT/CAG
 /AAT/CAT/TTT/GTG/GAC/GAA/TAT/GAT/CCA/ACA/ATA/GAG/GTA/AAT/CTT/GTT/TTA/AT
 A/TGC/ATA/TTA/CTG/GTG/CAG/GACCATTCT

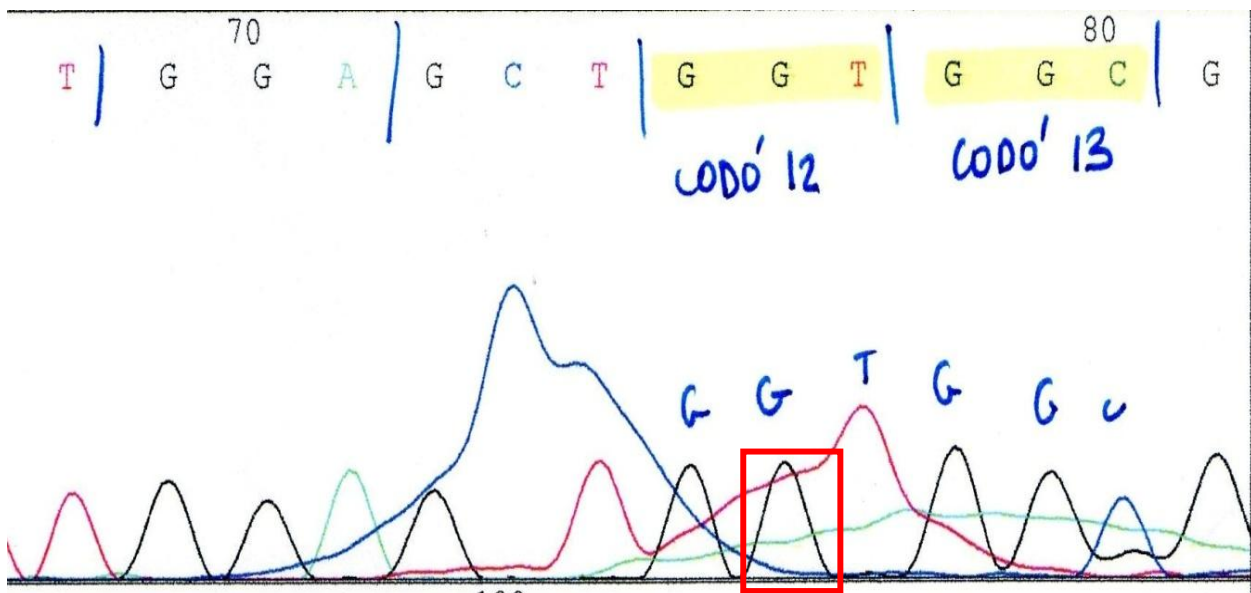


Figura 30. Resultats seqüenciació en el teixit tumoral de l'individu B. El rectangle vermell marca la presència de guanina. **Font:** Departament de seqüenciació de l'Hospital Clínic.

Discussió dels resultats:

Si llegim la seqüència obtinguda, en el codó dotze hi tenim GGT. Si observem la Figura 30, veiem que, efectivament, en el codó dotze hi tenim una guanina (rectangle vermell).

Si comparem la seqüència obtinguda amb el patró de la seqüència del KRAS, observem que no hi ha cap canvi.

Així doncs, l'individu B tampoc té cap mutació en el teixit tumoral.

4.3 Taula de resultats

Per resumir els resultats obtinguts en l'extracció de l'ADN, he fet una taula relacionant la variable independent (teixit sa/ teixit tumoral) amb la variable dependent (presència o no de la mutació del protooncogèn KRAS) (Taula 4).

Taula 4. Resum dels Resultats. Relació entre la variable dependent i la independent. **Font:** Realitzada per l'autor d'aquest treball

	INDIVIDU A		INDIVIDU B	
	Teixit sa	Teixit tumoral	Teixit sa	Teixit tumoral
Mutació KRAS		X		
No mutació KRAS	X		X	X

5.CONCLUSIÓ

En el individu A, la meua hipòtesi es va validar. En el teixit sa no hi havia cap mutació en la seqüència del gen KRAS, però en el teixit tumoral sí que hi havia la presència d'una mutació en el codó 12. Això implica un canvi d'una guanina a una timina (GGT → GTT) i per tant, provocarà un canvi d'aminoàcid de glicina a valina. Aquest canvi d'aminoàcid pot afectar a nivell de proteïna i a la seva funcionalitat. Aquesta nova proteïna formada, com hem explicat anteriorment, enviarà constantment senyals al nucli cel·lular perquè la cèl·lula es divideixi. Al ser un oncogèn, trencarà l'equilibri amb els gens supressors i això farà que el tumor prolifere més ràpidament.

Per tant, com he comentat en la introducció, la presència d'aquesta mutació és un marcador de mal pronòstic en el càncer colorectal. Des del punt de vista clínic és de rellevància en la decisió del seu tractament. Aquest pacient no se li podran aplicar teràpies com l'anti-EGFR i se li hauran d'aplicar teràpies alternatives depenent del seu estat.

KRAS és un protooncogèn conegut des de fa temps, i a laboratoris d'oncologia moleculars com el del Dr. Marià Monzó, es fan servir habitualment. Els resultats s'introdueixen a les seves bases de dades de pacients de càncer colorectal per ampliar el coneixement d'aquesta malaltia i així poder caracteritzar els pacients i els seus tractaments.

En el individu B, la meua hipòtesi no va ser certa. Tant el teixit sa com el tumoral no presentaven la mutació en el gen KRAS i per tant, la proteïna tindrà la seva funcionalitat correcta.

Aquest individu tindrà un pronòstic més positiu ja que al no tenir la mutació del gen KRAS, el càncer colorectal no serà tan violent i tindrà menys possibilitats de metàstasi. Possiblement se li podrà aplicar la teràpia anti-EGFR, però el fet de conèixer la presència o no de la mutació del KRAS, no implica que puguin existir altres complicacions i per tant, no se li pugui aplicar aquesta teràpia.

Tot i així per poder validar completament la meua hipòtesi s'haurien de fer més rèpliques amb teixits dels mateixos pacients.

Tant l'individu A, com l'individu B que no tenia el KRAS mutat, no podem afirmar que no hagin de presentar altres mutacions. Així doncs, a partir d'aquí podríem formular noves hipòtesis i nous problemes, com que tingués un altre gen mutat, com per exemple l'anomenat MYO1A. Molt recentment, un estudi publicat a la revista *Proceedings of National Academy of Science* (PNAS) per l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron de Barcelona ha descobert que el gen MYO1A produeix una proteïna que quan es troba en nivells alts protegeix l'estructura natural del teixit i evita el creixement de tumor cancerigen colorectal. Per tant, si aquest gen muta, la proteïna es troba en uns nivells molts baixos. S'ha demostrat que els pacients de càncer colorectal amb aquest gen mutat tenen una supervivència inferior a 1 any i en canvi els que no el tenen mutat sobreviuen més de 9 anys. El diari *La Vanguardia* es va fer ressò d'aquest estudi, amb un article publicat el dia 16 de gener del 2012. Aquestes publicacions recents dels darrers descobriments sobre teràpies noves per al càncer colorectal demostren l'interès social que desperta la incidència d'aquesta malaltia.

Així doncs, un nou estudi sobre aquest gen aportaria més informació als pacients estudiats i per tant els podríem trobar un tractament més adient al seu estat.

6. OPINIÓ PERSONAL

Durant aquest últim any, ha estat molt important per a mi la realització del treball de recerca. Abans d'aconseguir entrar al Departament del Dr. Marià Monzó, vaig intentar entrar al *Programa Argó* de la Universitat Autònoma de Barcelona i el *Jo Bioquímica* de la Universitat de Barcelona. També vaig realitzar un curs a *Els Juliols de la UB* relacionat amb les malalties neurodegeneratives, també de la Universitat de Barcelona. Tot i que finalment no he utilitzat en el meu treball de recerca el que vaig aprendre a *Els Juliols de la UB*, aquells 15 dies de conferències impartides per diferents metges especialistes en diferents disciplines em van aportar molts coneixements nous i interessants. I sobretot, el fet que les conferències estiguessin impartides a l'edifici Central de la Universitat i que les persones que assistien a aquest curs eren estudiants de diferents cursos de medicina i fins i tot metges, em va motivar a esforçar-me i a fer-me una petita idea del que pot ser l'ambient universitari.

Finalment, la meua estada al laboratori del Departament d'Embriologia i Anatomia Humana de la Facultat de Medicina de la UB a l'Hospital Clínic ha sigut una experiència que m'ha aportat molt: per una banda perquè he pogut ampliar els meus coneixements en l'àmbit biomèdic del treball, i de l'altre, en allò més personal.

Amb la realització del treball, no només he après molts conceptes nous, sinó que també he après el que és treballar en un laboratori i ser investigador.

7. GLOSSARI

1. **Mitosi:** és una fase del cicle cel·lular en què es produeix la divisió del nucli cel·lular de les cèl·lules eucariotes, mitjançant el qual es reparteixen les dues còpies del material genètic en dues meitats iguals, per formar els nuclis de les cèl·lules “filles” després de la divisió cel·lular.
2. **Meiosi:** és el procés de divisió cel·lular que permet a un cèl·lula diploide (doble material genètic) generar cèl·lules haploides (meitat de material genètic).
3. **Transcripció:** durant la transcripció genètica, les seqüències d'ADN són copiades a ARN mitjançant un enzim anomenat ARN-polimerasa. A l'hora d'afegir les bases nitrogenades complementàries en comptes de posar una timina on hi ha una adenina, es posa un uracil. La transcripció és un primer pas per a la síntesi de proteïnes.
4. **ARN:** és molt similar estructuralment a l'ADN, però té petites diferències pel que fa a l'estructura: l'ARN és present en forma de cadena simple; mentre que l'ADN hi és present en forma de doble cadena, l'ARN té la base nitrogenada uracil enlloc de la timina, entre d'altres. L'ARN sí que pot estar present al citoplasma de les cèl·lules, però en canvi l'ADN, no.
5. **Ribosomes:** els ribosomes fabriquen proteïnes a partir de les instruccions genètiques que hi ha a la molècula de RNA missatger.
6. **Traducció:** mitjançant aquest procés es formen les proteïnes a partir dels aminoàcids. Els aminoàcids s'ordenen de manera precisa a partir de la informació genètica continguda en la seqüència de nucleòtids de l'ADN.
7. **Citotòxic:** és la qualitat de les cèl·lules en tornar-se tòxiques. Aquestes tenen l'habilitat de matar altres cèl·lules.
8. **Expressió gènica:** procés pel qual a partir d'un gen se sintetitza un producte gènic corresponent, normalment, a una proteïna.
9. **Micropipeta:** és un instrument de laboratori utilitzat per absorbir i transferir petits

volums de líquids.

10. **Vortex:** és un aparell que serveix per agitar i homogeneïtzar el contingut de petits tubs o flascons de líquid.
11. **Bany termostàtic:** és un aparell que permet escalfar una substància a una determinada temperatura, o que es vol mantenir durant un cert temps a aquesta temperatura fixada.
12. **Centrífuga:** és un aparell que imprimeix moviment rotatori, amb una força de major intensitat que la gravetat, a una mescla provocant així la separació dels seus components. Els més densos precipiten i els menys densos queden damunt d'aquests.
13. **Genoma:** és tot el material genètic contingut en els cromosomes d'un organisme en particular.

8. BIBLIOGRAFIA

Llibres

- MUÑOZ, Alberto. *Cáncer. Genes y nuevas terapias*. 1a ed. Madrid. Editorial Hélice, 1997.
ISBN 84-921124-1-7
- AYALA, J. Francisco et. al. *Genética Moderna*. 1a ed. Barcelona. Ediciones Omega, 1984.
ISBN 84-282-0720-8
- COSTA, M. et al. *Biología. Conceptes bàsics. Ciència i tecnologia. Llibre de text de segon de Batxillerat*. Edicions Teide, 2010.
ISBN (no disponible).
- GRAN Enciclopèdia Catalana. Edicions Enciclopèdia catalana, 1999. Volumes 6,16 y 18.

Articles de revista

- HARARI, PM et al. "Biology of interactions: anti-epidermal growth receptor agents" *Journal Clinical Oncology*. Vol. 25 (2007), p. 4057-4065.
- LICAR, Alenka et. al. "Distribution of some activating KRAS and BRAF mutations in Slovene patients with colorectal cancer". *Medical Oncology*. Vol. 28 (2010), p. 1048-1053.
- MAXWELL, Patrick H. "Aspiring to prevent colon cancer." *Nature Medicine*. Vol.18 (2012), núm. 1, p. 32-33.
- ORTIZ-ZAPATER, Elena et al. " Key contribution of CPEB4-mediateed translational control to cancer progression" *Nature Medicine*. Vol.18 (2012), p. 83-90.

Articles de diari

- "Trobada una proteïna que encén gens tumorals". *El Periódico* (5 de desembre del 2011), p. 35.
- "El Vall d'Hebron identifica una proteïna que reduce los tumores colorrectales". *La Vanguardia versió digital* (16 de gener del 2012).

Tríptics

- Pla Director d'Oncologia et. al. *Estil de vida saludable: codi europeu contra el càncer* [material gràfic]. Barcelona. Tríptic.
- Mercè Peris Tuser, Especialista en medicina preventiva i salut pública. Institut Català d'Oncologia [material gràfic]. Barcelona. Tríptic.
- Oficina Tècnica de l'Hospital del Mar i de l'Hospital Clínic. *Programa de detecció precoç de còlon i recte de Barcelona*. [material gràfic]. Barcelona. Tríptic.

Documents en línia

- VAQUÉ, Josep. Epidemiologia i prevenció del càncer [en línia]. Barcelona: Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, 2011.
http://www.vhebron.net/preventiva/docencia/classes/t21b_cancer.pdf [Consulta: des del mes de setembre de 2011 fins a gener de 2012].
- Programa de detecció precoç de còlon i recte de Barcelona [en línia]. Barcelona: Oficina tècnica de l'Hospital del Mar i de l'Hospital Clínic.
<http://www.prevenciacolonbcn.org/index.html> [Consulta: des del mes de setembre de 2011 fins a gener de 2012].
- Canal Salut, Càncer [en línia]. Barcelona, Generalitat de Catalunya.
<http://www20.gencat.cat/portal/site/cancer/menuitem.c55b6cfe04a239f796072d10b0c0e1a0/vgnextoid=0d5213a323b73210VgnVCM1000000b0c1e0aRCRD&vgnextchannel=0d5213a323b73210VgnVCM1000000b0c1e0aRCRD&vgnextfmt=default> [Consulta: des del mes de setembre de 2011 fins a gener de 2012].
- Informació sobre el càncer [en línia]. Barcelona, Institut Català d'Oncologia, Generalitat de Catalunya.
http://www.iconcologia.net/castella/cancer/inf_cancer.htm# [Consulta: des del mes de setembre de 2011 fins a gener de 2012].

Altres

- Fotocòpies i informació subministrada per l'equip del Dr. Marià Monzó del Departament d'embriologia i anatomia humana de l'Hospital Clínic i Facultat de Medicina de l'UB.
- QIAquick[®] Spin Handbook: QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide

Removal Kit and QIAquick Gel extraction kit. Sample & Assay Technologies, QUIAGEN®, març 2008.

- El Biomarcador KRAS: nuevo biomarcador predictivo, en CCRm. Panitumamab, la terapia personalizada anti-EGFR en el cáncer colorrectal metastático (CCRm), AMGEN® Oncología.

9.ANNEXOS

ANNEX 1: Taula del “codi genètic” .

		Segona lletra				
		U	C	A	G	
Primera lletra (extrem 5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } stop UAG } stop	UGU } Cys UGC } UGA } stop UGG } Trp	Tercera lletra (extrem 3')
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	

Font: aquesta imatge ha estat extreta de Aula3 “El Codi genètic”.

Adreça web: <http://aulatres.wikispaces.com/El+codi+gen%C3%A8tic>

ANNEX 2: Tríptic “Un estil de vida saludable”.

UN ESTIL DE VIDA SALUDABLE

codi europeu contra el càncer

L'estat de salut en general pot millorar-se i especialment alguns tipus de càncer poden evitar-se mitjançant l'adopció d'un estil de vida més saludable:

No fumeu. Si sou fumador, deixeu de fumar al més aviat possible. Si fumeu, no ho feu en presència de persones no fumadores, especialment de nens i nenes.

Limiteu el consum d'alcohol. Si beveu alcohol, sigui cervesa, vi o licors, limiteu el seu consum diari. Es recomana no beure més de dues consumicions els homes i una consumició les dones.

Mengeu fruites, verdures i cereals. Això és el més adequat per a la prevenció de tumors. Limiteu el consum d'aliments rics en greixos d'origen animal.

Eviteu l'obesitat. L'exercici físic regular i una alimentació baixa en calories eviten l'excés de pes. Sempre esteu a temps a començar.

Feu exercici. La pràctica d'exercici físic d'intensitat moderada i de manera regular, com ara caminar diàriament durant mitja hora, té un efecte beneficiós.

Compte amb el sol. Eviteu les exposicions perllongades al sol i les cremades solars, especialment en els infants. Extremeu les mesures de protecció si teniu tendència a cremar-vos amb el sol.

Eviteu les substàncies cancerígenes. Seguiu estrictament les normes destinades a evitar qualsevol tipus d'exposició a substàncies cancerígenes. Compliu les mesures de seguretat d'aquestes substàncies.

Vacuneu-vos contra l'hepatitis B. Es recomana la vacunació contra el virus de la infecció de l'hepatitis B.

Es recomana revisions per la **detecció precoç del càncer de coll d'úter** mitjançant a les dones a partir dels 25 anys d'edat.

Es recomana que les dones a partir dels 50 anys d'edat participin en els programes de **detecció precoç de càncer de mama** amb mamografia.

Es recomanen revisions per la **detecció precoç de càncer colorectal** en els homes i les dones a partir dels 50 anys.

SÍMPTOMES D'ALERTA PELS QUALS CAL CONSULTAR EL METGE:

- si noteu algun bony, una ferida que no cicatritza (fins i tot a la boca), una piga que canvia de forma, mida o color, o qualsevol pèrdua anormal de sang.
- en casos de problemes persistents, com tos o ronquera permanents, alteracions intestinals o urinàries, o pèrdua anormal de pes.

codi europeu contra el càncer



Font: Generalitat de Catalunya.

Informació addicional del tríptic extreta de: <http://www20.gencat.cat/portal/site/cancer>

ANNEX 4: Tríptic del “Programa de detecció precoç del càncer colorectal”.

Programa de detecció precoç de càncer de còlon i recte

El programa s'adreça als homes i les dones de 50 a 69 anys.

El càncer de còlon i recte

El càncer de còlon i recte és un dels més freqüents entre els homes i les dones de més de 50 anys. Si es detecta a temps, és molt fàcil de tractar i té moltes probabilitats de curar-se.

El càncer colorectal no acostuma a causar cap molèstia fins que la malaltia està molt avançada. Per això, és important fer un diagnòstic precoç i detectar-lo abans que comenci a produir símptomes.

Tingueu cura de la vostra salut

- Augmenteu el consum de fruita i verdura.
- Limiteu el consum d'aliments amb greixos d'origen animal.
- Feu exercici físic regularment.
- Eviteu l'obesitat.
- Si beveu, modereu el consum de begudes alcohòliques.
- No fumeu.

Programa de detección precoz de cáncer de colon y recto

El programa se dirige a los hombres y mujeres de 50 a 69 años.

El cáncer de colon y recto

El cáncer de colon y recto es uno de los más frecuentes entre los hombres y mujeres de más de 50 años. Si se detecta a tiempo, es muy fácil de tratar y tiene muchas probabilidades de curarse.

El cáncer colorectal no suele causar ninguna molestia hasta que la enfermedad está muy avanzada. Por esta razón, es importante hacerse un diagnóstico precoz y detectarlo antes de que empiece a producir síntomas.

Cuide su salud

- Aumente el consumo de fruta y verdura.
- Limite el consumo de alimentos con grasas de origen animal.
- Practique ejercicio físico regularmente.
- Evite la obesidad.
- Si bebe, modere el consumo de bebidas alcohólicas.
- No fume.

Si voleu més informació, podeu adreçar-vos al vostre metge o metgessa, farmacèutic o farmacèutica habitual, o podeu trucar a

Sanitat Respon 24 hores
902 111 444 

Si desea más información, puede dirigirse a su médico o farmacéutico habitual, o puede llamar a Sanitat Respon

Amb la col·laboració de:
Con la colaboración de:

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

hospitaldelmar

C.S.B. Consorci Sanitari de Barcelona

IMAS Institut Municipal d'Assistència Sanitària

 **COL·LEGI DE FARMACÈUTICS DE BARCELONA**

Programa de detecció precoç de càncer de còlon i recte



 **Generalitat de Catalunya Departament de Salut**

 **PROGRAMA DE DETECCIÓ PRECOÇ DE CÀNCER DE CÒLON I RECTE**

Què és el Programa de detecció precoç de càncer de còlon i recte?

El Programa s'adreça a homes i dones d'entre 50 i 69 anys i consisteix a fer-se, cada dos anys, una prova senzilla i còmoda a casa per detectar si les deposicions contenen petites quantitats de sang que no es veuen a simple vista.

La majoria de vegades el càncer de còlon i recte es desenvolupa a partir de petites lesions de l'interior del budell (pòlips). El càncer en la fase més inicial i els pòlips poden sangrar de manera intermitent sense produir cap molèstia.

¿Qué es el Programa de detección precoz de cáncer de colon y recto?

El Programa se dirige a hombres y mujeres de entre 50 y 69 años y consiste en hacerse, cada dos años, una prueba sencilla y cómoda en casa para detectar si las deposiciones contienen pequeñas cantidades de sangre que no se ven a simple vista.

La mayoría de las veces el cáncer de colon y recto se desarrolla a partir de pequeñas lesiones del interior del intestino (pólipos). El cáncer en su fase más inicial y los pólipos pueden sangrar de modo intermitente sin producir ninguna molestia.

Com hi podeu participar?

Properament, rebreu una carta amb les instruccions que heu de seguir per fer-vos la prova, que consisteix a recollir una mostra de les vostres deposicions a casa.

Un cop retorneu la mostra, s'enviarà al laboratori i, en unes setmanes, us comunicaran el resultat per correu o per telèfon.

¿Cómo puede participar?

Próximamente, recibirá una carta con las instrucciones que debe seguir para hacerse la prueba, que consiste en recoger una muestra de sus deposiciones en casa.

Una vez devuelva la muestra, se enviará al laboratorio y, en unas semanas, le comunicarán el resultado por correo o por teléfono.

Tothom ha de participar-hi?

Heu de consultar el vostre metge o metgessa:

- Si presenteu signes i símptomes de càncer de còlon com ara la presència de sang en les deposicions, canvis en els hàbits intestinals durant més de sis setmanes, pèrdua de pes o cansament inexplicables o malestar abdominal persistent.
- Si teniu dos o més familiars de primer grau (parens, germans, fills) diagnosticats de càncer de còlon o si teniu un o més familiars de primer grau diagnosticats de càncer de còlon abans dels 60 anys.
- Si heu estat diagnosticats de malaltia inflamatòria intestinal, póliposi, adenomes o càncer de còlon i recte.

¿Todo el mundo debe participar?

Debe consultar a su médico:

- Si presenta signos y síntomas de cáncer de colon como la presencia de sangre en las deposiciones, cambios en los hábitos intestinales durante más de seis semanas, pérdida de peso o cansancio inexplicable o malestar abdominal persistente.
- Si tiene dos o más familiares de primer grado (padres, hermanos, hijos) diagnosticados de cáncer de colon, o si tiene un o más familiares de primer grado diagnosticados de cáncer de colon antes de los 60 años.
- Si se le ha diagnosticado enfermedad inflamatoria intestinal, poliposis, adenomas o cáncer de colon y recto.

Què heu de fer si en el resultat de la prova no hi ha indicis de sang?

En aquest cas, és poc probable que tingueu un càncer de còlon. Tot i així, si teniu molèsties heu de consultar el vostre metge o metgessa.

Passats dos anys, us tornaran a oferir fer-vos la prova.

¿Qué debe hacer si en el resultado de la prueba no hay indicios de sangre?

En este caso, es poco probable que tenga un cáncer de colon. Aun así, si tiene molestias debe consultar a su médico.

Pasados dos años, le volverán a proponer hacerse la prueba.

Què heu de fer si en el resultat de la prova hi ha indicis de sang?

En aquest cas, és probable que tingueu una lesió benigna (com els pòlips) i només en pocs casos la sang s'explica per la presència d'un càncer. Davant d'aquest resultat, us oferiran fer-vos una colonoscòpia, que és una exploració de l'interior del budell que es fa amb sedació i que té un risc baix de complicacions.

¿Qué debe hacer si en el resultado de la prueba hay indicios de sangre?

En este caso, es probable que tenga una lesión benigna (como los pólipos) y solo en pocos casos la sangre se explica por la presencia de un cáncer. Ante este resultado, le propondrán hacerse una colonoscopia, que es una exploración del interior del intestino que se realiza con sedación y que tiene un bajo riesgo de complicaciones.

Quin és el procediment si us detecten un pòlip?

La majoria de pòlips que es detecten són benignes, però en un petit percentatge de casos es poden convertir en càncer. Per això, s'extreuen durant la colonoscòpia.

¿Cuál es el procedimiento si le detectan un pólipo?

La mayoría de los pólipos que se detectan son benignos, pero en un pequeño porcentaje de casos se pueden convertir en cáncer. Por esta razón, se extraen durante la colonoscopia.

Quin és el procediment si us detecten un càncer?

Si el càncer de còlon es detecta en la fase inicial, hi ha més probabilitats de curar-se. En aquest cas, us oferiran el tractament més adequat al més aviat possible.

¿Cuál es el procedimiento si le detectan un cáncer?

Si el cáncer de colon se detecta en su fase inicial, hay más probabilidades de curarse. En este caso, le ofrecerán el tratamiento más adecuado lo antes posible.

Font: Oficina Tècnica de l'Hospital del Mar i de l'Hospital Clínic. *Programa de detecció precoç de còlon i recte de Barcelona.*

Informació addicional extreta de:

<http://www.prevenciacolonbcn.org/>

ANNEX 5: Protocol d'extracció de l'ADN d'un teixit humà (kit Qiagen)

Abans de començar:

- × Mirar que totes les ampolles del Kit tinguin el que han de tenir
- × Connectar un "bany" a 55°C i un altre a 70°C
- × Si el teixit és fixat, el rentarem un parell de cops amb PBS abans de començar el protocol

Protocol:

1. Posar 25 mg de teixit¹ a una placa de Petri
2. Afegir 360 µl de BUFFER ATL a la placa
3. Triturar el teixit al màxim amb ajuda de dos bisturis
4. Pipetejar el lisat i passar-lo a un tub de 1,5 ml
5. Afegir 20 µl de Proteinassa K
6. Vortex fort → 15"
7. Incubar a 55°C → de 1 a 3 hores (Si cal es pot deixar tota la nit)
8. Vortex fort → 15"
9. Afegir 200µl de Buffer AL²
10. Vortex fort → 15"
11. Incubar a 70°C → 10'
12. Vortex fort → 15"
13. Afegir 200µl d'Etanol Absolut
14. Vortex fort → 15"
15. Passar-ho TOT a una columna
16. Centrifugar a 8000rpm → 1'
17. Descartar filtrat o tub col·lector
18. Afegir 500µl de Buffer AW1
19. Centrifugar a 8000rpm → 1'
20. Descartar filtrat o tub col·lector
21. Afegir 500µl de Buffer AW2

1 Si el teixit és molt cel·lular amb 10mg n'hi ha prou

2 El precipitat blanc desapareix a l'hora de incubar. No interfereix l'extracció. Si és massa gelatinós al posar el buffer AL el farem més líquid agitat o amb vòrtex forts abans de posar l'etanol.

22. Centrifugar a màxima velocitat → 3'
23. Descartar el tub (Per assegurar que no quedi etanol)
24. Centrifugar columna buida → 1' a 14000 rpm
25. Passar la columna a un tub de 1,5 ml
26. Afegir 100µl de Buffer AE, preescalfat a 55°C, a la columna
27. Incubar les columnes tapades a 55°C → 5'
28. Centrifugar a 8000 rpm → 5'
29. Descartar la columna
30. Fer una dilució 1:10 per quantificar ADN
31. Quantificar ADN diluït
32. Descartar la dilució un cop quantificada
33. Guardar al congelador ADN no diluït

ANNEX 6: Protocol de purificació d'ADN de teixit humà.

QIAquick PCR Purification Kit Protocol

using a microcentrifuge

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions (see page 8). For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge.

Important points before starting

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at 17,900 x g (13,000 rpm) in a conventional tabletop microcentrifuge at room temperature.
- Add 1:250 volume pH indicator I to Buffer PB (i.e., add 120 µl pH indicator I to 30 ml Buffer PB or add 600 µl pH indicator I to 150 ml Buffer PB). The yellow color of Buffer PB with pH indicator I indicates a pH of ≤7.5.
- Add pH indicator I to entire buffer contents. Do not add pH indicator I to buffer aliquots.
- If the purified PCR product is to be used in sensitive microarray applications, it may be beneficial to use Buffer PB without the addition of pH indicator I.

Procedure

1. **Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene.**

For example, add 500 µl of Buffer PB to 100 µl PCR sample (not including oil).

2. **If pH indicator I has been added to Buffer PB, check that the color of the mixture is yellow.**

If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µl of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.

3. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**
4. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**
5. **Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube.**
Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.
6. **To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**
7. **Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min.**

IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

Font: Protocol subministrat pel Departament d'Embriologia i Anatomia Humana de l'Hospital Clínic-Universitat de Barcelona. *QIAquick Spin Handbook* (2008). *Sample and Assay Technologies*.

ANNEX 7: Patró seqüència KRAS

```

121 CGCAGGCACTGAAGGGCGGCGGGGCCAGAGGCTCAGCGGCTCCCAGGTGCGGGAGAGA
.....
.....
181 GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAARCTTWGTGRGTRGTGGAGCTG**R**Y*****KYRCTAGRRCAAG*
.....ATGACTGAATATAAACTTGTGCTAGTTGGAGCTGCTGGCGTAGGCAAG
.....-M--T--E--Y--K--L--V--V--V--C==A==C==C==V==C--K-

*RRMKWYRRMWWYYSYSY*
241 AGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTGTGGAGAATATGATCCAACAATA
49 AGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTGTGGAGAATATGATCCAACAATA
17 =S==A==L==T--I--Q==L==I--Q--N--H==F--V--D--E==Y--D--P==T--I-

R
301 CAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTACTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTC
109 CAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTACTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTC
37 -E--D--S--Y--R--R--K--Q--V--V--I--D--G--E--T--C--L--L--D--I--L-

YRSVS*MMHKR****S*RRM
361 GACACAGCAGCTCAAGCAGGTACACTGCAATGAGGCACCAGTACATCAGCACTGGGGAG
169 GACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACACTGCAATGAGGCACCAGTACATCAGCACTGGGGAG
57 -D--T==A==C==Q==E==E--Y--S--A--M==R==D--Q--Y--M--R--T=-G--E-

RK
421 GCCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAAATAACTAAATCATTGAAGATATTACCATTAT
229 GCCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAAATAACTAAATCATTGAAGATATTACCATTAT
77 -G--F--L--C=-V--F--A--I--N--N--T--K--S--F--E--D--I--H--H--Y-

481 AGAGAACAATTAAAAAGAGTTAAAGGACTCTGAAGATGTACCTATGGTCTAGTAGGAAAT
289 AGAGAACAATTAAAAAGAGTTAAAGGACTCTGAAGATGTACCTATGGTCTAGTAGGAAAT
97 -R--E--Q--I--K--R--V--K--D--S--E--D--V--P--M--V--L--V--G--N-

W
541 AATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTAGACACAAAACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGT
349 AATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTAGACACAAAACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGT
117 =K--C--D--L--P--S--R--T--V--D--T--K--Q--A--Q--D--L--A--R--S-

WRYKW*S
601 TATGGAATTCCTTTTATTGAAACATCACCAAAGACAAGACAGGGTGTTGCATGATGCCTTC
409 TATGGAATTCCTTTTATTGAAACATCAGCAAAGACAAGACAGGGTGTTCATGATGCCTTC
137 -Y--G--I--P--F=-I--E--T--S--A=-K--T--R--Q--G--V==D=-D--A--F=

RH
661 TATACATTAGTTCGAGAAATTCGAAAACATAAACAAAAGATGAGCAAAGATCGTAAAAAAG
469 TATACATTAGTTCGAGAAATTCGAAAACATAAACAAAAGATGAGCAAAGATCGTAAAAAAG
157 -Y--T--L--V--R--E--I--R=-K--H--K--E--K--M--S--K--D=-G--K--K-

721 AAGAAAAAGCAAGTCAAAGACAAAAGTGTGTAATTATGTAAATACAATTTGTACTTTTTTCT
529 AAGAAAAAGCAAGTCAAAGACAAAAGTGTGTAATTATGTAAA.....
177 -K--K--K--K--S--K--T--K--C--V--I--M--*.....

781 TAAGGCATACTAGTACAAGTGGTAATTTTTGTACATTACACTAAATTATTAGCATTGT
.....
.....

```

Font: Subministrada per Rut Tejero i Gerardo del Departament d'Embriologia i Anatomia Humana de l'Hospital Clínic-Universitat de Barcelona.

